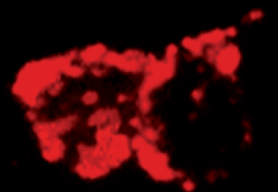


Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

Análisis de los mecanismos  
de especificación de las  
neuronas CCAP/Bursicón  
en el sistema nervioso central  
de *Drosophila melanogaster*

Marta Moris Sanz  
Madrid, 2014







Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

**Análisis de los mecanismos  
de especificación de las  
neuronas CCAP/Bursicón  
en el sistema nervioso central  
de *Drosophila melanogaster***

Memoria presentada por  
**Marta Moris Sanz**  
para optar al título de Doctor en Ciencias por  
la Universidad Autónoma de Madrid  
Madrid, 2014

Director de Tesis:  
**Fernando J. Díaz-Benjumea**  
Tutor de Tesis:  
**Javier Díez Guerra**



El presente trabajo ha sido realizado en el laboratorio del Dr. Fernando Jiménez Díaz-Benjumea, en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), con la ayuda de la beca predoctoral JAE concedida por el CSIC (JAEPRe-08-01279), un contrato a cargo del proyecto de investigación “Especificación de destinos neuronales en el desarrollo del sistema nervioso central de *Drosophila*” BFU2011-24315 y un contrato a cargo del proyecto de investigación “From genes to shape: analysis of morphogenesis in *Drosophila* and vertebrates” BFU2011-24315





*A mis cuatro padres, Paloma, Gonzalo, Diego y María*

*A mis tres hermanos, Juan, Celia y María*





# Agradecimientos

---



Quiero dar agradecer a todas las personas que de una forma u otra me ha ayudado a realizar esta tesis.

Quiero dar especialmente las gracias a Fernando, por haberme dado la oportunidad de desarrollar esta tesis y por haber estado siempre dispuesto a enseñarme y a escucharme.

A Pilar, por su no doblegarse ante las normas establecidas, por la pasión con la que se entrega a sus inquietudes científicas. A Bea, por haberme dado el empujón final sin el cual no habría conseguido llegar hasta aquí. A Alicia, por estar siempre detrás de mí y acabarme los experimentos. A Javi, por entrenarme y mantenerme siempre informada. A todos los estudiantes, por traer aire nuevo al laboratorio. A Dani, por ayudarme a mi llegada al laboratorio.

A Richi, por haber respondido pacientemente a todas mis preguntas. A Rocío por ser tan honesta y feliz. A Sol, por sus cómicas protestas. A Carol, por ser una experta en todo. A Ana, por sus constantes ánimos.

A la toda la gente del departamento, por ayudarme siempre que lo he necesitado. Por hacer que el día a día sea más agradable.

To the people of the Gerhad Technau' lab, thank you very much for letting me be part of your group during my stay. Thanks to Lichi to be my host, inside and outside of the lab.

Al servicio de microscopia por su amabilidad y su eficiencia. Al servicio de cocina y a todos los servicios del centro por ser un soporte fundamental. A la radio, por acompañarme durante las muchas horas que he pasado en el microscopio.

A mi madre, por haber estado siempre a mi lado, porque gracias a ella he llegado hasta aquí, por haber sido siempre capaz de ponerse en mi lugar y haberme ayudado en cada etapa de mi vida, por ser todo un referente para mí. A mi padre, por su apoyo incondicional, por haberme enseñado el valor de la lectura, la cultura y el arte. A Diego, por haber mantenido despierta mi curiosidad e imaginación, por sorprenderme cada día. A María, por enseñarme a hacer las cosas con cariño y paciencia hasta que queden perfectas, por cuidar de mí como una más de la familia. A Juan, por enseñarme que ser feliz es lo mejor que se puede hacer en la vida. A Celia, porque a pesar de ser mucho más pequeña que yo es para mí un ejemplo a seguir. A MiniMaría, porque su cariño y admiración me obligan a sacar lo mejor de mí. A mis tres hermanos, por hacerme sonreír pase lo que pase, por reclamarme y recibirme siempre con un abrazo.

A todos los Moris, por aportarme cada uno de ellos su grano de arena y ayudarme a seguir hacia adelante. Gracias por ser una familia tan unida. A Pepe por estar siempre vigilante y no dejar que nunca perdiera el hilo. A mi abuela Emilia, por haberme querido tanto.

A mis primos Sanz-Garnica, por esas comidas que han cambiado mi forma de ver la vida. A mi tía Merce, por organizarlas y cuidar de mí llevándome al teatro e invitándome a merendar. A los toledanos por todo su cariño. A mis tíos Gerardo y Jaime, por enseñarme a ser fuerte y determinante.

A Miguel bombero, por iniciarme en el mundo de la biología.

A Margarita y a Manuel por acogerme tan cariñosamente.

A Tamara, por enseñarme que no hay que tener miedo, que poco a poco todo se consigue, y que la vida son dos días. A Nerea, por su risa constante y sus cariños infinitos. A Jimena, por mostrarme que las cosas siempre se pueden hacer de otra forma. A Elena, por demostrarme que hacer cosas de adultos no significa apoltronarse. A Yaiza, por darme siempre el consejo que necesitaba, por ser mi cumbiera intelectual. A Karmen, por su ironía y su agudeza. A Almudena, por abrirme siempre su casa de par en par. A Bea, por su vitalidad y entusiasmo. A Marina, por ser como mi espejo.

A Marta, por estar junto a mí durante tantos años y por saber que siempre puedo contar ella.

A Irene, por haberme dado la oportunidad de ser su amiga.

A Pauline et Malou, merci beaucoup pour tous les bons moments qu'on a partagés. N'importe où on habitera, on restera toujours voisins.

A mis compañeros de carrera y de máster, porque con ellos, trabajos, risas, clases y fiestas se han mezclado durante todo el tiempo que hemos compartido. A Lucía y Alfonso, por haberme motivado y ser un referente de exigencia. A Pilar, por su cariño y su apoyo.

Al grupo de biología, de tenis o de Ciudad Lineal, por hacerme participe de sus aventuras.

A mis profesores, del colegio y de la Universidad, por haberme inculcado las ganas de aprender.

A los miembros del tribunal, por haber respondido tan amablemente a la invitación.

A David, por escucharme, por no fallarme nunca, por hacer de cada día un día mejor, por divertirme, por exigirme, por hacerme mejor persona y sobre todo, por hacerme feliz.

Muchas gracias a todos.

Gracias



La vida no es un problema a resolver, sino una realidad a experimentar.

*Alan Watts*



# Summary

---



During the development of the Central Nervous System, a great number of specific cell fates that expressing different neuropeptides and neurotransmitters are established. The study of how this process takes place it would be helpfull to known how a set of neurons is specified. At the end of embryogenesis this peptide is expressed along with the neuropeptide Bursicon, in a set of around 40 neurons that includes interneurons (CCAP-INs) and efferent neurons (CCAP-ENs). Hence, we took the expression of the Crustacean Cardioacceleratory Peptide (CCAP) as a model system.

First, we analyzed the pattern of expression of CCAP and Bursicon and observed that CCAP-INs are formed in every segments from S1 to A7 and that CCAP-ENs are spatially and temporally restricted: present from T3 to A4 in 18h old embryos and from T3 to A7 in late third instar larvae. We also observed that all CCAP neurons are generated by the neuroblast (NB) 3-5. We used the expression of the gene *empty spiracles (ems)* as a reporter to characterize the early lineage of NB3-5 and found that it generates two ganglion mother cells (GMCs) during its Hunchback (Hb) temporal window, which in turn give rise to four cells, and another two cells during the Krüppel temporal window.

Second, we performed loss and gain-of-function experiments to study the role of Hox genes in the segment-specific appearance of CCAP-neurons. We found that the genes *Ultrabithorax* and *abdominal-A* prevent the apoptosis of the CCAP-ENs in the T3-A4 segments and thus control the special distribution of CCAP neurons. Additionally, we established that the gene *Abdominal-B* controls the temporal onset of the expression of CCAP and Bursicon in the CCAP-ENs present in segments A5-7.

Third, we determined that CCAP-EN and CCAP-IN are not siblings cells, otherwise they are generated sequentially by the first and second GMC of the NB 3-5. These two GMCs acquire different indentities due to the continuous increase of Hb expression levels in the NB3-5. We also showed that Hb plays a role in the neuron, since its overexpression in the CCAP-ENs is enough to turn them into CCAP-INs.

Finally, in order to integrate the previous data, we searched for genes required for the specification of the CCAP-neuronal fate. As a result of a genetic screening, we identified that five genes involved in this process : *empty spiracles (ems)*, *teashirt (tsh)*, *elbow/noc (el/noc)* and *tailup (tup)*

To sum up, the results presented in this work provide new knowledge about the role of temporal and homeotic genes in neural specification and describe a model system for future research.





# Resumen

---



Durante el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) se genera un gran número de tipos celulares diferentes. Con el fin de profundizar en el estudio de la especificación neuronal en este trabajo nos propusimos dilucidar cómo se especifican dos tipos neuronales del SNC de *Drosophila melanogaster*: las interneuronas CCAP/Bursicón (CCAP-INs) y las neuronas eferentes CCAP/Bursicón (CCAP-NEs). Ambos tipos celulares se caracterizan al final de la embriogénesis por la expresión de los neuropéptidos Crustacean Cardioacceleratory Peptide (CCAP) y Bursicón.

En primer lugar, determinamos que el neuroblasto (NB) 3-5 es el progenitor de las neuronas CCAP/Bursicón estudiando el patrón de expresión de CCAP y Bursicón en diferentes genotipos mutantes y líneas reporteras. Utilizamos el gen *empty spiracles (ems)* como reportero para caracterizar el linaje temprano del NB3-5 y observamos que este genera dos células madre ganglionares (CMGs) durante la ventana temporal Hunchback (Hb), las cuales a su vez dan lugar a 4 células. Posteriormente, el NB3-5 entra en la ventana temporal Krüppel.

En segundo lugar, con el fin de estudiar el papel de los genes homeóticos en la especificación segmental de las neuronas CCAP/Bursicón, analizamos los fenotipos de los mutantes de ganancia y pérdida de función de estos genes. Concluimos que la expresión de *Ultrabithorax* o *abdominal-A* se requiere para evitar la apoptosis de las CCAP-NEs de los segmentos T3-A4. Además, hallamos que *Abdominal-B* controla temporalmente la activación de los neuropéptidos CCAP y Bursicón retrasándola hasta el tercer estadio larvario.

En tercer lugar, analizamos el linaje del NB3-5. Determinamos que la CCAP-NE y la CCAP-IN se originan a partir de la primera y segunda CMG respectivamente y que estas CMGs adquieren distintas identidades como consecuencia del incremento en los niveles de expresión de Hb en el NB3-5. Mostramos también que la expresión de altos niveles de Hb en la CCAP-NE es suficiente para transformarla en CCAP-IN.

Por último, con el fin de entender cómo se integran los resultados expuestos anteriormente buscamos genes implicados en la especificación de las neuronas CCAP/Bursicón. De este modo encontramos 5 factores de transcripción *empty spiracles (ems)*, *teashirt (tsh)*, *elbow/noc (el/noc)* and *tailup (tup)* con estas características.

En suma, los resultados presentados en este trabajo han permitido profundizar en el estudio de la función de los genes temporales y homeóticos en la especificación neural así como describir un sistema modelo para futuras investigaciones.





# Índice

---



ABREVIATURAS .....	3
INTRODUCCIÓN .....	5
1. ¿QUÉ SE CONSIDERA UN TIPO NEURONAL? .....	7
2. ¿SON TODAS LAS NEURONAS DIFERENTES? .....	8
3. MECANISMOS DE ESPECIFICACIÓN NEURONAL EN EL DESARROLLO DEL SNC DE VERTEBRADOS .....	8
3.1. Determinación espacial .....	8
3.1.1. El eje antero-posterior: las motoneuronas del la médula espinal .....	8
3.1.2. El eje dorso-ventral: la médula espinal .....	9
3.2. Determinación temporal .....	10
4. <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> COMO ORGANISMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE ESPECIFICACIÓN NEURONAL .....	11
4.1. Origen común del SNC de artrópodos y vertebrados .....	11
4.2. Características del desarrollo de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	12
5. MECANISMOS DE ESPECIFICACIÓN EN EL DESARROLLO DEL CUERDA NERVIO-SA VENTRAL DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> .....	13
5.1. Desarrollo de la cuerda nerviosa ventral de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	13
5.2. Especificación de los NBs: la regionalización del NE y las olas de delaminación .....	15
5.2.1. Los genes segmentales .....	15
5.2.2. Los genes columnares .....	16
5.2.3. Las olas de delaminación .....	17
5.2.4. Los genes homeóticos .....	18
5.3. Especificación de las CMGs: los genes temporales .....	19
5.3.1. Función de los genes temporales .....	19
5.3.2. Regulación de la expresión de los genes temporales .....	19
5.4. Especificación de las células hermanas: la ruta de Notch .....	21
6. LAS NEURONAS CCAP/BURSICÓN COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE ESPECIFICACIÓN NEURAL .....	22
6.1. Análisis de la diferenciación de un destino neuronal como modelo de estudio .....	22
6.2. Los neuropéptidos CCAP y Bursicón .....	22
6.3. Las neuronas CCAP/Bursicón .....	23
OBJETIVOS .....	29
MATERIAL Y MÉTODOS .....	31
1. ESTIRPES DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> UTILIZADAS .....	33
2. GENERACIÓN DE LA LÍNEA <i>EMS-GAL4</i> .....	35
3. SISTEMA GAL4/UAS .....	36
3.1. Descripción del sistema .....	36
3.2. Determinación de la secuencia de aparición de las neuronas CCAP/Bursicón .....	36

4. EXPERIMENTOS DE FLIP-OUT .....	37
4.1. Sistema Flp/FRT .....	37
4.2. Identificación del NB progenitor de las neuronas CCAP/Bursicón.....	37
5. TINCIONES CON 5-BROMO-2-DESOXIURIDINA.....	38
6. TINCIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS .....	38
7. ANTICUERPOS UTILIZADOS .....	39
8. GENERACIÓN DE ANTICUERPO $\alpha$ -CCAP .....	41
9. OBTENCIÓN DE IMÁGENES POR MICROSCOPIA CONFOCAL .....	41
10. MEDICIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE HB .....	41
11. ESTUDIO ESTADÍSTICO .....	41
RESULTADOS .....	43
1. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LOS PÉPTIDOS CCAP Y BURSICÓN .....	45
1.1 Patrón de expresión de CCAP y Bursicón en larva de tercer estadio .....	45
1.2. Patrón de expresión de CCAP y Bursicón en embriones de estadio 17 .....	45
2. IDENTIFICACIÓN DEL NB PROGENITOR DE LAS CÉLULAS CCAP/BURSICÓN ....	47
2.1. Coexpresión de las neuronas CCAP/Bursicón con distintos marcadores.....	47
2.2. Identificación del momento de delaminación del NB progenitor de las neuronas CCAP/ Bursicón .....	49
2.3. Estudio de la función de los genes columnares en la especificación de las neuronas CCAP/ Bursicón .....	50
3. ANÁLISIS DEL LINAJE TEMPRANO DEL NB 3-5 .....	52
4. ESTUDIO DEL PAPEL DE LOS GENES HOMEÓTICOS EN LA ADQUISICIÓN DEL DESTINO CCAP/BURSICÓN .....	52
4.1. Análisis de la función de los genes homeóticos en la especificación de las neuronas CCAP/ Bursicon .....	55
4.2. Estudio de la función de los genes <i>Ubx</i> y <i>abd-A</i> .....	55
4.2.1. <i>Ubx</i> y <i>abd-A</i> actúan de forma redundante en la especificación de las CCAP- NEs de los segmentos del T3 al A4.....	55
4.2.2. La expresión ectópica de <i>Ubx</i> es suficiente para evitar la apoptosis de las CCAP NEs de los segmentos del S1 al T2 .....	57
4.2.3. La expresión ectópica de <i>abd-A</i> causa la pérdida de las neuronas CCAP/Bursi cón.....	59
4.3. <i>Abd-B</i> reprime la expresión de los neuropéptidos CCAP y Bursicón en las CCAP-NEs tardías .....	59
4.3.1. Expresión de Abd-B a lo largo del desarrollo .....	59
4.3.2. La falta de función de <i>Abd-B</i> permite la diferenciación de las CCAP-NEs tar días al final de la embriogénesis .....	61
4.3.3. La expresión ectópica de <i>Abd-B</i> impide la diferenciación de todas las neuronas CCAP/Bursicón .....	61
4.3.4. <i>Ubx</i> y <i>abd-A</i> evitan la apoptosis de las CCAP-NEs tardías .....	62

<b>5. IDENTIFICACIÓN DE LA VENTANA TEMPORAL EN LA QUE SE GENERAN LAS CÉLULAS CCAP/BURSICÓN.....</b>	<b>62</b>
5.1. Las células CCAP/Bursicón se generan en la ventana Hb .....	62
5.1.1 La pérdida de función de <i>hb</i> provoca la pérdida de las neuronas CCAP/Bursicón.....	65
5.1.2. La expresión ectópica de <i>hb</i> da lugar a CCAP-INs ectópicas en todos segmentos.....	65
5.2. Las CCAP-NEs se generan antes que las CCAP-INs .....	65
5.3. Los niveles de expresión Hb aumentan en el NB 3-5 a lo largo de su ventana .....	67
5.4. Diferentes niveles de expresión de Hb distinguen la CCAP-IN de la CCAP-EN .....	67
5.4.1. Las CCAP-NEs y CCAP-INs expresan bajos y altos niveles de Hb respectivamente .....	69
5.4.2. Niveles altos de <i>hb</i> en la neurona son suficientes para transformar las CCAP-ENs en CCAP-INs .....	69
5.4.3. Niveles bajos de expresión <i>hb</i> impiden la generación de las CCAP-INs y dan lugar a CCAP-NEs ectópicas .....	71
<b>6. ESTUDIO DE LA RUTA DE NOTCH EN LA ESPECIFICACIÓN DEL DESTINO CCAP/BURSICÓN .....</b>	<b>71</b>
6.1. Efecto de la inactivación de la ruta de Notch en la neuronas CCAP/Bursicón .....	71
6.2. Efecto de la activación ectópica de la ruta de Notch en la neuronas CCAP/Bursicón....	73
6.3. La apoptosis como posible destino de las células hermanas de las neuronas CCAP/Bursicón .....	74
6.4. Estudio de la ruta de Notch y la apoptosis en el linaje del NB 3-5 .....	74
<b>7. BÚSQUEDA DE GENES IMPLICADOS EN LA ESPECIFICACIÓN DE LAS NEURONAS CCAP/BURSICÓN.....</b>	<b>75</b>
7.1. Factores de transcripción con una función o expresión conocida en el SNC.....	75
7.2. Análisis de deficiencias genéticas .....	75
7.3. Análisis de la función de los genes implicados en la especificación de las neuronas CCAP/Bursicón .....	75
7.2.1. El gen <i>empty spiracles</i> .....	77
7.2.2. El gen <i>islet</i> .....	77
7.2.3. El complejo <i>elbow/no ocelli</i> .....	78
7.2.4. El gen <i>teashirt</i> .....	79
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>81</b>
<b>1. EL LINAJE DEL NB 3-5 COMO SISTEMA MODELO.....</b>	<b>83</b>
1.1. El estudio de la especificación neural requiere marcadores de identidad celular .....	83
1.2. Los marcadores celulares de linaje .....	83
1.3. El linaje temprano del NB 3-5.....	84
<b>2. LOS GENES HOMEÓTICOS CONTROLAN ESPACIAL Y TEMPORALMENTE LA DIFERENCIACIÓN DE LAS NEURONAS CCAP/BURSICÓN.....</b>	<b>85</b>

2.1. Las CCAP-INs se generan en todos los segmentos y no requieren de ningún gen homeótico para su especificación .....	85
2.2. <i>Ubx</i> y <i>abd-A</i> evitan la apoptosis de las CCAP-NEs presentes en los segmentos T3-A7 .....	86
2.3. <i>Abd-B</i> controla la diferenciación terminal de las CCAP-NEs de los segmentos A5-A7 .....	87
<b>3. LA FUNCIÓN DE HB EN LA ESPECIFICACIÓN NEURAL.....</b>	<b>88</b>
3.1. Distintos niveles de expresión de <i>hb</i> en el NB permiten la generación de diferentes tipos neuronales.....	88
3.2. La función de <i>hb</i> en las neuronas .....	89
3.3. <i>ikaros</i> , el homólogo de <i>hb</i> en vertebrados.....	90
<b>4. NUEVOS GENES IMPLICADOS EN LA ESPECIFICACIÓN DE LAS NEURONAS CCAP/ BURSICÓN: <i>EMS</i>, <i>ISL</i>, <i>ELB</i>, <i>NOC</i>, <i>THS</i>.....</b>	<b>91</b>
4.1. Función de los nuevos genes identificados en la adquisición del destino CCAP/bursicón .....	91
4.1.1. El gen <i>empty spiracles</i> .....	91
4.1.2. El gen <i>islet</i> .....	92
4.1.3. El complejo <i>elbow/no ocelli</i> .....	92
4.1.4. El gen <i>teashirt</i> .....	92
4.2. Integración de la función de <i>ems</i> , <i>isl</i> , <i>elB</i> , <i>noc</i> y <i>tsh</i> con el resto de mecanismos de especificación previamente analizados.....	92
 CONCLUSIONES .....	 95
 BIBLIOGRAFÍA.....	 99
 ANEXO 1: TABLAS .....	 117
1. TABLA 1: Resumen de los fenotipos presentados en este trabajo.....	119
2. TABLA 2: Estudio de los genes cuya falta de función no altera el patrón de expresión de las neuronas CCAP/Bursicón.....	122
3. TABLA 3: Estudio de las deficiencias Zinn.....	125
4. TABLA 4: Análisis de los genes implicados en la especificación de las neuronas CCAP/Bursicón .....	127
5. FIGURA S.1: Patrón de expresión de la construcción <i>elav-Gal4</i> en el linaje temprano del NB3-5.....	127
 ANEXO 2: PUBLICACIONES.....	 129







# Abreviaturas

---



<b>ABLKs</b> .....	abdominal leucokinergic neurons
<b>A</b> .....	abdomen
<b>A1</b> .....	segmento abdominal 1
<b>aCC</b> .....	anterior Corner Cell
<b>AR</b> .....	ácido retinóico
<b>Burs</b> .....	Bursicón
<b>BrdU</b> .....	5-bromo-2'-desoxiuridina
<b>CCAP</b> .....	Crustacean Cardioacceleratory Peptide
<b>CCAP-EN</b> ...	neurona CCAP/Bursicón eferente
<b>CCAP-IN</b> ....	interneurona CCAP/Bursicón
<b>ETH</b> .....	ecdysis-triggering hormone
<b>FGFs</b> .....	factores de crecimientos de fibroblastos
<b>FLP</b> .....	Flipase
<b>FRT</b> .....	Flipase Recombination Target
<b>CMG</b> .....	célula madre ganglionar
<b>CNV</b> .....	cuerda nerviosa ventral
<b>LK</b> .....	leucokinina
<b>NE</b> .....	neuroectodermo
<b>NB</b> .....	neuroblasto
<b>pCC</b> .....	posterior Corner Cell
<b>S</b> .....	subesófago
<b>S1</b> .....	segmento subesogágico 1
<b>SNC</b> .....	sistema nervioso central
<b>T</b> .....	torax
<b>T1</b> .....	segmento torácico 1



# Introducción

---



Los organismos multicelulares se originan a partir de una única célula o cigoto mediante un conjunto de cambios progresivos que denominamos desarrollo. Tras la fecundación, la acción secuencial de la proliferación, la morfogénesis y la diferenciación permite la generación del individuo adulto. Una de las preguntas más interesantes dentro de la biología del desarrollo, la materia que estudia estos procesos, es entender cómo se genera la enorme diversidad celular presente en un organismo adulto; cómo las células deben comunicarse e integrar las informaciones que reciben a la vez que proliferan para dar lugar a tipos celulares que desarrollarán funciones precisas en el individuo adulto.

Se estima que el cerebro humano está compuesto por unas  $8,6^{10}$  neuronas (Azevedo et al., 2009) y aunque se desconoce cuantos tipos neuronales lo conforman, es posiblemente el órgano con mayor diversidad celular (Wichteler, 2013). Además, el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) presenta un alto grado de precisión ya que la formación de una red neuronal funcional requiere la generación de tipos neuronales concretos en lugares y momentos específicos. Todo esto hace que el SNC sea un sistema idóneo para tratar de entender como a partir de un número reducido de células progenitoras se genera un número tan importante de tipos celulares distintos en un patrón espacial y temporal preciso.

## 1. ¿Qué se considera un tipo neuronal?

A finales del S. XIX, Santiago Ramón y Cajal enunció la doctrina neuronal según la cual las neuronas son entidades funcionales independientes conectadas entre sí (revisado por Lopez-Munoz et al., 2006). Desde entonces, entender cómo funciona el SNC pasa por identificar los distintos tipos neuronales. Sin embargo, cómo se define un tipo neuronal es una cuestión controvertida.

Las neuronas se clasificaron primeramente en base a su morfología. Este criterio además de ser sencillo y por consiguiente operativo, es altamente informativo. La morfología de una neurona refleja las conexiones que realiza y por lo tanto da cuenta de su función. También se utilizaron otros criterios como la actividad eléctrica o la expresión de genes y/o proteínas (revisado por Masland, 2004). Sin embargo, estas clasificaciones no reconocen la naturaleza dinámica de las neuronas. Por otra parte, salvo los receptores olfativos, los tipos neuronales maduros no pueden definirse por la expresión de un único gen. Es por esto que algunos autores definen un tipo neuronal como un estado molecular basal, estable y compartido. Según esta clasificación las neuronas de un mismo tipo expresan a lo largo de su vida una batería de genes que determinan su forma y su función. Una vez que adquirida su identidad, las neuronas son capaces de responder a una variedad de señales internas y externas, por lo que, aunque neuronas de un mismo tipo compartan un conjunto de genes, miembros individuales pueden variar su perfil génico dependiendo del contexto y de la actividad (revisado por Fishell y Heintz, 2013; Hobert et al., 2010; Wichterle et al., 2013).

El perfil génico de neuronas seleccionadas o escogidas al azar puede describirse mediante diversas técnicas: los chips de ADN, la secuenciación de ARN mensajeros o la reacción en cadena de la

polimerasa en tiempo real. A pesar de los importantes avances moleculares, genéticos e informáticos de los últimos años, la descripción molecular de los distintos tipos neuronales que componen el SNC acaba de iniciarse.

## 2. ¿Son todas las neuronas diferentes?

El tamaño del cerebro es extremadamente variable dentro del reino animal. Se estima que el cerebro de las ballenas está formado por unas  $200^9$  neuronas (Williams et al., 1998) mientras que el de *Drosophila melanogaster* contiene tan solo unas  $100^3$  neuronas (Peng et al., 2011). Varios trabajos relacionan el aumento en el tamaño del cerebro con una mayor precisión y detalle en el proceso de percepción, un mayor procesamiento paralelo de la información y una mayor capacidad de almacenaje. Sin embargo, animales con un mayor número de neuronas no presentan un mayor repertorio de pautas de comportamiento ni mayores capacidades cognitivas (revisado por Chittka y Niven, 2009). Por lo tanto, cabe esperar que una vez se analice el perfil génico de todas las neuronas que forman el SNC, en los animales con un mayor número de neuronas, estas se agrupen en tipos neuronales y no conformen por sí solas una identidad única.

## 3. Mecanismos de especificación neuronal en el desarrollo del SNC de vertebrados

Los organismos vertebrados presentan el SNC con mayor complejidad del reino animal. En cada región, multitud de tipos neuronas y células gliales diferentes se generan siguiendo un orden preciso (Guillemot, 2007). Las células progenitoras neurales deben por tanto integrar información espacial y temporal para dar lugar a la gran diversidad de tipos celulares presentes.

### 3.1. Determinación espacial

#### 3.1.1. El eje antero-posterior: las motoneuronas de la médula espinal

Las motoneuronas de la médula espinal son un sistema modelo frecuentemente utilizado para estudiar la influencia de la regionalización anterior-posterior en la generación de distintos tipos neuronales. Alta concentración de ácido retinóico (AR) generado por los somitos promueve las identidades anteriores, mientras que, la difusión de los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) procedentes de región proliferativa posterior dan lugar a identidades posteriores (revisado por Davis-Dusenbery et al., 2014). Ambas señales se integran controlando la expresión de los genes homeóticos (Dasen et al., 2003)(Fig.I.1A). Estos genes, son los encargados de dar identidad a los diferentes segmentos del organismo. Se caracterizan por el fenotipo causado por su falta de función, la transformación de unos segmentos en otros, así como por integrar en su secuencia codificante el dominio homeobox (McGinnis y Krumlauf, 1992). De forma consistente con su papel en la regionalización del cuerpo, la expresión de los genes homeóticos en la médula espinal determina la identidad segmental de las

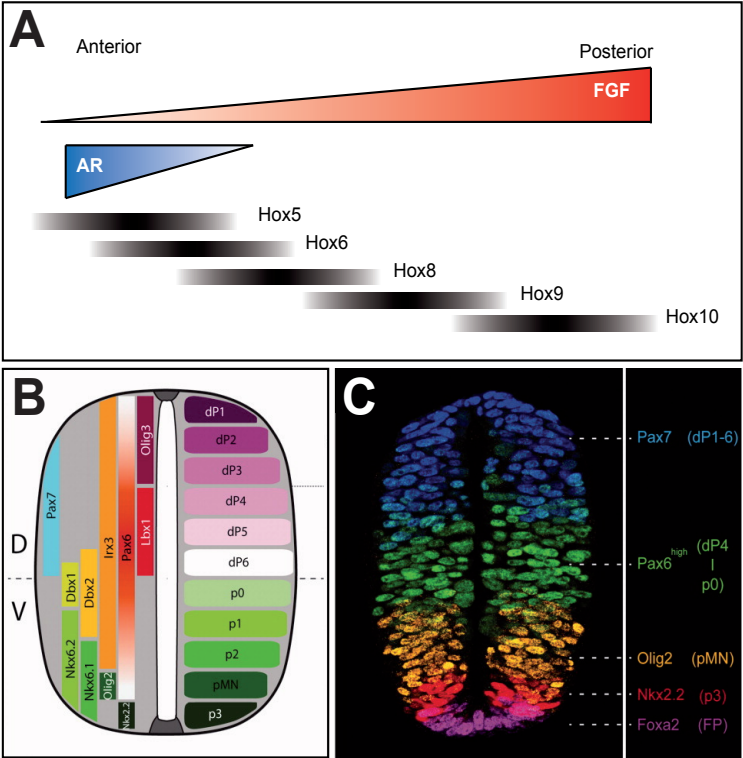


motoneuronas a lo largo del eje antero-posterior. No obstante, el proceso es más complejo ya que los genes homeóticos también están involucrados en la especificación de distintas neuronas en un mismo segmento (Dasen y Jessell, 2009).

### 3.1.2. El eje dorso-ventral: la médula espinal

La regionalización dorso-ventral ha sido principalmente estudiada en la médula espinal, aunque mecanismos análogos controlan la formación del eje dorso-ventral en el cerebro (revisado por Lupo et al., 2006). En ambos casos, uno de los factores clave es la proteína difusible Sonic Hedgehog (Shh).

En la médula espinal, Shh se expresa en la notocorda y la línea media ventral, generando un gradiente de concentración desde la parte ventral hacia la parte dorsal. Un conjunto de factores de transcripción responden a este gradiente activándose, en el caso de las proteínas de clase I, o reprimiéndose, en el caso de las proteínas de clase II, en función de los distintos niveles de concentración de Shh. Posteriormente, la represión mutua entre las dos clases de proteínas permite el establecimiento de 5 dominios definidos de progenitores ventrales (p3, pMN y p2-0 de ventral a dorsal) (figura de (Le Dreau y Marti, 2012)). Paralelamente, la expresión de las proteínas Wnt y de BMP desde la línea media dorsal da lugar a 6 dominios dorsales (P1-6 de dorsal a ventral) (Le Dreau y Marti, 2012; Lupo et al., 2006; Ulloa y Briscoe, 2007) (Fig.I.1B-C).

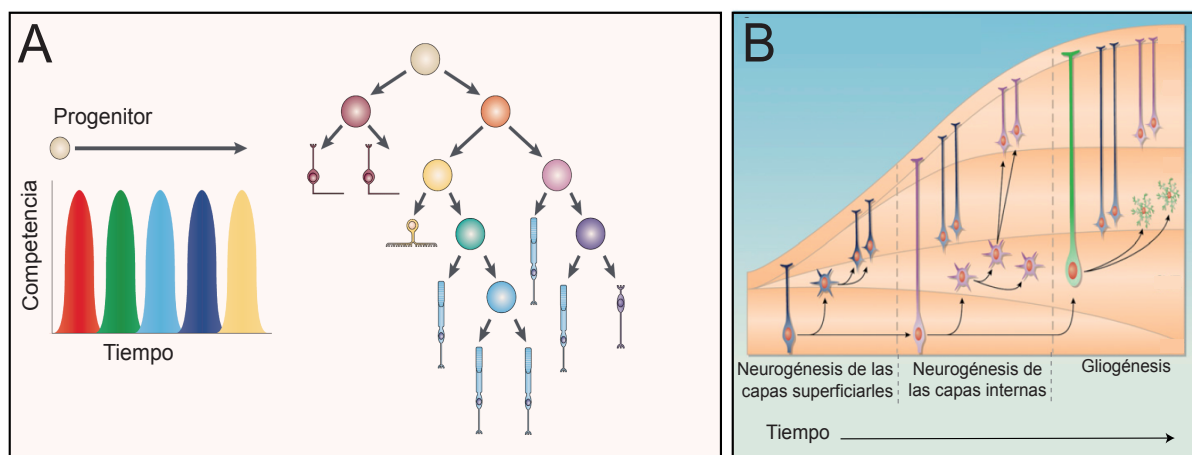


**Fig. I.1. Determinación espacial en el desarrollo del SNC de vertebrados**  
**(A)** Esquema de la expresión a lo largo de eje antero posterior de los factores difusibles FGF y AR. La expresión en gradientes contrapuestos controla la activación de los distintos genes homeóticos en regiones específicas del tubo neural. Modificada de Dasen y Jessell, 2009. **(B)** Esquema de una sección transversal del tubo neural de pollo de 51-56 horas de desarrollo. En la parte izquierda se muestra la expresión de proteínas de clase I en la región dorsal (D) y clase II en la región ventral (V). En la parte derecha se muestra la división del tubo neural en 11 dominios de progenitores neurales. Modificada de Le Dreau y Marti, 2012 **(C)** Reconstrucción fotográfica de un tubo neural de pollo en la que se muestra la expresión de distintas proteínas, tanto de clase I como de clase II, que dividen el tubo neural en distintos dominios. Modificada de Le Dreau y Marti, 2012.

### 3.2. Determinación temporal

La retina neural es uno de los tejidos del SNC donde se ha estudiado la determinación temporal. Se ha demostrado que los 7 tipos celulares distintos que la conforma aparecen en un orden estereotipado y que una misma célula progenitora puede generar varios de estos tipos celulares (revisado por Centanin y Wittbrodt, 2014). Basándose en estos datos, Cepko *et al.* enunciaron el modelo de competencia según el cual, las células progenitoras pasan por distintos estados de competencia durante los que generan uno o varios tipos de células retinales (Cepko et al., 1996)(Fig.I.2A). Posteriormente, se identificó el gen *ikaros* como el responsable de conferir el estado de competencia temprana: se observó que su falta de función provocaba una reducción en los destinos tempranos sin aumentar los destinos tardíos, mientras que su expresión ectópica forzaba la producción de destinos tempranos por parte de progenitores tardíos (revisado por Bassett y Wallace, 2012).

Otro sistema modelo en el que se ha estudiado la determinación temporal de tipos celulares es la corteza cerebral, compuesta por un 20% interneuronas y 80% neuronas de proyección. Estas últimas se organizan tanto anatómica como funcionalmente en 6 capas y se generan a partir de progenitores situados en la capa ventricular y en la capa subventricular de la corteza. Las neuronas nacientes migran originando en primer lugar las capas más internas y después, las más externas (Fig.I.2B). Varios trabajos demuestran que un mismo progenitor puede generar neuronas de capas superficiales e internas sugiriendo la existencia de factores temporales capaces de dar identidad a los diferentes grupos de neuronas (revisado por Han y Sestan, 2013; Franco y Muller, 2013). Por otra



**Fig.I.2. Determinación temporal en el desarrollo del SNC de vertebrados**

(A) Modelo de competencia en la formación de la retina. Un progenitor pasa por distintas olas de competencia (indicadas por los diferentes colores) durante las cuales es competente para generar un solo tipo celular. Cabe señalar que el progenitor gana y pierde la capacidad de generar un tipo celular en función del tiempo, lo que contrasta con el modelo de restricción progresiva. Modificada de Livesey y Cepko, 2001 (B) Modelo de restricción progresiva en la formación de la corteza cerebral. El progenitor genera de forma secuencial todos los tipos de neuronas de proyección y células gliales, en primer lugar las neuronas que conformarán las capas más externas, posteriormente las que darán lugar a las capas internas y por último a las células gliales. En este modelo, el progenitor pierde la capacidad de generar distintos tipos celulares en función del tiempo. Modificada de Franco y Muller, 2013.

parte, experimentos de trasplante pusieron de manifiesto que progenitores tempranos pueden dar lugar a neuronas tardías, pertenecientes a las capas más superficiales, mientras que progenitores tardíos son incapaces de generar neuronas tempranas (Desai y McConnell, 2000). Estos resultados se explican con el modelo de restricción progresiva (revisado por Han y Sestan, 2013; Franco y Muller, 2013) según el cual, las células progenitoras sufren cambios intrínsecos a lo largo del tiempo que se traducen en la generación de distintos subtipos de neuronas de proyección.

En ambos modelos experimentales se ha aportado datos que señalan una posible heterogeneidad dentro de la población de células progenitoras (Bassett y Wallace, 2012; Centanin y Wittbrodt, 2014; Franco et al., 2012). Es razonable pensar que ambos mecanismos, la diversificación de las células progenitoras y la facultad de cada una de ellas de generar varios destinos celulares en una secuencia temporal, coexisten en el desarrollo del SNC.

## **4. *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para el estudio de los mecanismos de especificación neuronal**

### **4.1. Origen común del SNC de artrópodos y vertebrados**

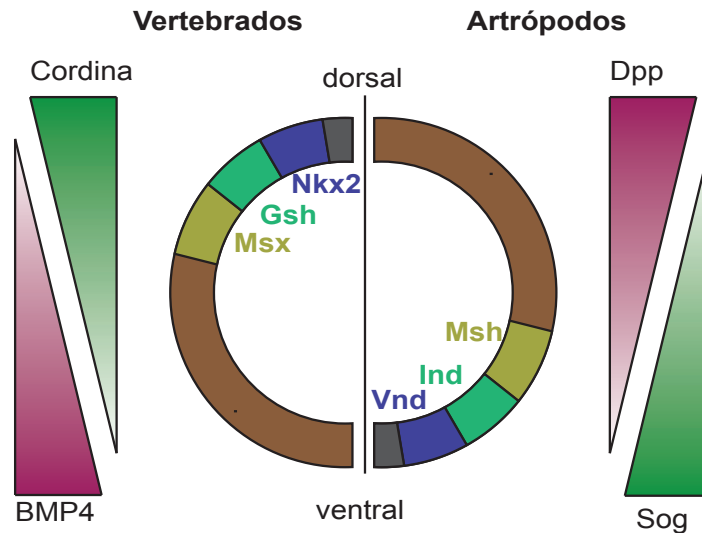
Desde comienzos del siglo XX se ha utilizado *Drosophila melanogaster* como animal de experimentación dada las enormes ventajas que ofrece para el análisis genético. Sin embargo, para poder validar este organismo como un modelo para el estudio del desarrollo del SNC es importante entender la relación filogenética entre el SNC de vertebrados y de artrópodos.

El SNC de vertebrados se forma en la parte dorsal mediante un proceso de invaginación denominado neurulación, mientras que el de artrópodos se forma en la parte ventral por delaminación (revisado por Arendt y Nubler-Jung, 1999). Basándose en estas diferencias tanto topográficas como morfogenéticas, los estudios más clásicos proponen un origen evolutivamente independiente del SNC en vertebrados y artrópodos.

Sin embargo, un número importante de evidencias sugieren que el SNC de vertebrados y artrópodos comparten un origen común. En primer lugar, tanto en vertebrados como en artrópodos, la región neurogénica se establece mediante la oposición de los gradientes de expresión de dos morfógenos: Short gastrulación en el epitelio ventral de *Drosophila melanogaster* y su ortólogo BMP4 en el epitelio dorsal de vertebrados permiten la especificación de la región neuroectodérmica antagonizando la acción de Decapentaplegic en la mosca y de Cordina en vertebrados. Mecanismos similares controlados por genes ortólogos pero que se expresan en ejes invertidos dan lugar a SNC homólogos (Arendt y Nubler-Jung, 1999; Urbach y Technau, 2008) (Fig.I.3).

Por otra parte, existe una conservación de los mecanismos de regionalización del eje dorso-ventral. En *Drosophila melanogaster* los genes *ventral nervous system defective (vnd)* , *intermediate*

*neuroblas defective (ind)* y *muscle segment homeodomain (Msh)*, definen tres columnas neurogénicas (medial, intermedia y lateral respectivamente) a lo largo del eje dorso-ventral. Sus ortólogos respectivos *Nkx2 (vnd)*, *Gsh(ind)* y *Msx (Msh)* realizan la misma función en el SNC de vertebrados (Arendt y Nubler-Jung, 1999; Cornell y Ohlen, 2000; Urbach y Technau, 2008) (Fig.I.3).



**Fig.I.3. Regionalización del eje dorso-ventral de vertebrados y artrópodos.**

Representación de la mitad de la pared corporal de vertebrados y artrópodos en una sección transversal. En ambos casos el polo dorsal se encuentra arriba y el ventral abajo. Las proteínas difusibles Dpp y BMP4 forman un gradiente, invertido en vertebrados con respecto a *Drosophila melanogaster*. A estos gradientes se oponen los de las proteínas Sog y Cordina respectivamente, otro par de proteínas homólogas, que determinan la región neurogénica. Esta región será posteriormente compartimentalizada por la expresión de Vnd/Nkx2, Ind/Gsh y Msh/Msx en los dominios medial, intermedio y lateral. Modificada de Lichtneckert y Reichert, 2005.

Asimismo, la regionalización del eje antero-posterior presenta similitudes entre ambos grupos animales. Los genes homeóticos dan identidad a las distintas regiones de la CNV de *Drosophila melanogaster* y la médula espinal vertebrados. También las regiones más anteriores del SNC de *Drosophila melanogaster* y de vertebrados se especifican por mecanismos homólogos. Los genes *empty spiracles (ems)* y *orthodenticle (ota)* y sus ortólogos en vertebrados *Emx* y *Otx* presentan expresiones y funciones similares en la especificación de regiones específicas del cerebro (Lichtneckert y Reichert, 2005).

La conservación de estos mecanismos genéticos de especificación neural apoya la hipótesis de un origen común del SNC de vertebrados y artrópodos. Su diferente localización en ambos grupos animales se explicaría por una inversión del eje dorso-ventral (De Robertis, 2008; De Robertis y Sasai, 1996). El cómo se ha producido esta inversión del eje y cuál puede haber sido su disposición original es un debate que aún hoy en día sigue abierto (Holland et al., 2013).

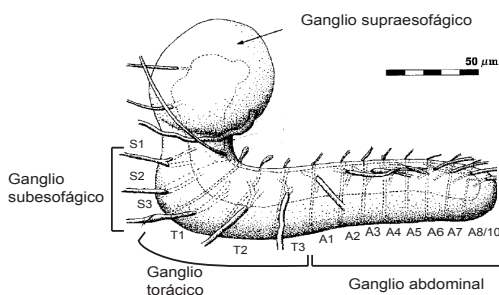
## 4.2. Características del desarrollo de *Drosophila melanogaster*

*Drosophila melanogaster* sufre una metamorfosis completa en el curso de su desarrollo por lo que se le

considera un organismo holometábolo. Su ciclo vital se divide en cuatro etapas: la fase embrionaria que dura 22 horas en condiciones estándar de laboratorio (25°C y 60% de humedad) y comprende desde la puesta del huevo hasta la eclosión de este; la fase larvaria, subdividida a su vez en 3 estadios larvarios de 24, 24 y 48 horas, durante los cuales los individuos reptan en busca de alimento; la fase pupal que se alarga 120 horas y en la que tiene lugar la metamorfosis tras la cual comienza la fase adulta (Greenspan, 2004). El individuo adulto se caracteriza por poseer alas, patas y un complejo sistema de órganos sensoriales externos. *Drosophila melanogaster* es una especie al polimórfica con dos fenotipos claramente diferenciados, el larvario y el adulto. Cada uno de ellos presenta un SNC generado tras un proceso de neurogénesis permitiendo a las moscas adaptarse a sus condiciones cambiantes de vida.

## 5. Mecanismos de especificación en el desarrollo del cuerda nerviosa ventral de *Drosophila melanogaster*

### 5.1. Desarrollo de la cuerda nerviosa ventral de *Drosophila melanogaster*



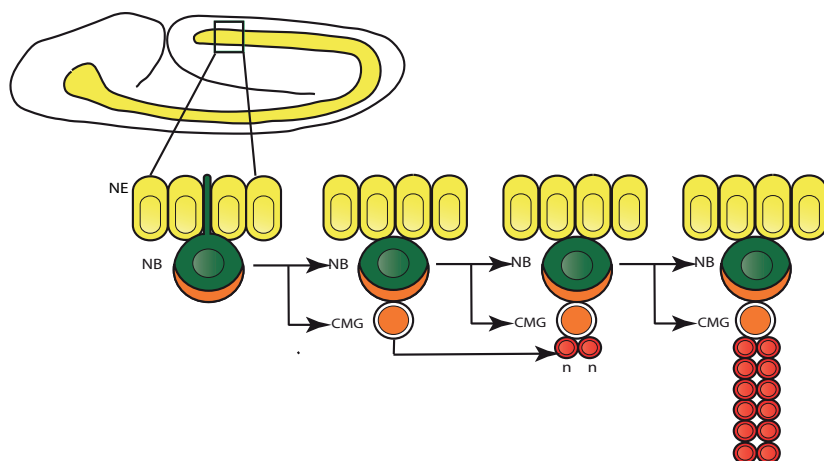
**Fig.I.4. Dibujo esquemático de un SNC de un embrión de estadio 17 en una visión lateral**

Se muestran los ganglios supraesofágico, subesofágico, torácico, y abdominal; así como la división segmental de cada uno de ellos. Modificada de Ito *et al.* 1995.

El SNC de *Drosophila melanogaster* está formado por cuatro ganglios, el ganglio supraesfágico o cerebro, el ganglio subesofágico, el ganglio torácico y el ganglio abdominal (Fig.I.4). La fusión de estos tres últimos forma la cuerda nerviosa ventral (CNV) (Hartenstein, 1993). Dada su relativa simplicidad, el desarrollo del la CNV de *Drosophila melanogaster* ha sido ampliamente utilizado como modelo para el análisis de los mecanismos de especificación neuronal.

Al igual que el resto de los órganos de la mosca, el SNC está segmentado. El cerebro lo conforman tres segmentos: proto, deuto y tritocerebro. El ganglio subesofágico y el ganglio torácico se componene de tres segmentos cada uno, S1-S3 y T1-T3 respectivamente, y el ganglio abdominal de 10, A1-A10 (Hartenstein, 1993) (Fig.I.4). La línea media divide cada segmento a lo largo del eje antero-posterior en dos mitades especulares, denominadas hemisegmentos o hemineurómeros.

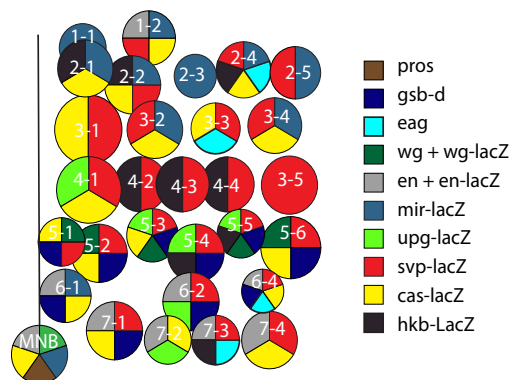
El primer paso para la formación del CNV en *Drosophila melanogaster* es el establecimiento de una región neuroectodérmica en la parte ventro-lateral del embrión. Esta región se especifica mediante la oposición de los gradientes de Sog y Dpp. Posteriormente, la expresión de los genes proneurales confiere a grupos de células neuroectodérmicas o grupos de equivalencia, el potencial de convertirse en célula madre neuronal o neuroblasto (NB). La ruta de señalización de Notch restringe



**Fig.I.5. Formación de la CNV durante la neurogénesis embrionaria**

Los NBs delaminan del NE hacia el interior del embrión, se dividen asimétricamente generando un nuevo NB y una CMG. El paso de la proteína Prospero (naranja) del citoplasma del NB al núcleo de la CMG limita la capacidad regenerativa de esta última. Así, la CMG se divide una única vez para dar lugar a dos células que se diferenciarán como neuronas o glia.

la expresión de genes proneurales a una única célula progenitora por cada grupo de equivalencia mediante un proceso de inhibición lateral entre células vecinas. Finalmente la célula seleccionada sufre un proceso de delaminación mientras que el resto adquiere identidad epidérmica. Poco después, el NB ya interiorizado se dividen de forma asimétrica generando un nuevo NB y una célula más pequeña denominada célula madre ganglionar (CMG) (revisado por Egger et al., 2008; Homem y Knoblich; Skeath y Thor, 2003). La localización nuclear de la proteína Prospero en la CMG, activa un programa de diferenciación y limita su proliferación (Choksi et al., 2006). De este modo, la CMG se divide únicamente una vez, dando lugar a dos células que se diferencian como neuronas o células gliales (Fig.I.5). Recientemente se ha observado que en ciertos linajes la CMG puede diferenciarse directamente como neurona (Baumgardt et al., 2014).



**Fig.I.6. Mapa de NBs**

Representación esquemática de los NBs presentes en un hemisegmento derecho del SNC de un embrión de estadio 11. La barra vertical representa la línea media. Se indica el número de cada NB y los marcadores que expresa. La imagen está orientado con anterior arriba. Modificada de <http://www.neuro.uoregon.edu/doelab/nbmap.html>

En cada hemisegmento de la CNV delaminan 30 NBs en una disposición estereotipada. Cada uno de ellos recibe un nombre compuesto por dos números que describen su posición. El primero hace referencia a la fila en la que se encuentra y el segundo, a la columna. Esta nomenclatura propuesta por C.Q.Doe (Doe, 1992) se basa en la homología de los NBs de *Drosophila melanogaster* con de los descritos previamente en el saltamontes. Además, cada NB puede identificarse por la expresión de un conjunto que marcadores moleculares (Doe, 1992) (Fig.I.6).

Se han descrito varios mecanismos generadores de diversidad celular en la CNV de *Drosophila melanogaster*. Estos explican cómo los NBs, las CMGs, y las dos células hermanas originadas por estas, adquieren identidades únicas (Lin y Lee, 2012). A continuación introduciremos brevemente cada uno de ellos.



## 5.2. Especificación de los NBs: la regionalización del NE y las olas de delaminación

Varios autores demostraron que cada NB genera una progenie fija y única trazando el linaje de los 30 NBs presentes en un hemisegmento con un colorante fluorescente (DiI-labeling) (Bossing et al., 1996; Schmid et al., 1999; Schmidt et al., 1997). Caracterizaron cada linaje por el tipo de células que lo componen (células gliales, neuronas) así como por el número e identidad de cada una de ellas. Paralelamente, se observó que células neuroectodérmicas trasplantadas a distintas posiciones dentro del eje antero-posterior o dorso-ventral, así como cultivadas *in vitro* son capaces de generar la progenie característica de su lugar de origen (Luer y Technau, 2009; Prokop et al., 1998; Udolph et al., 1995). Estos resultados pusieron de manifiesto que, antes de delaminar, las células progenitoras adquieren una identidad única, la cual más tarde se traducirá en la generación de un linaje característico. La regionalización del NE mediada por la acción conjunta de los genes columnares y segmentales permite que cada NB adopte un destino distinto en función de su lugar de delaminación.

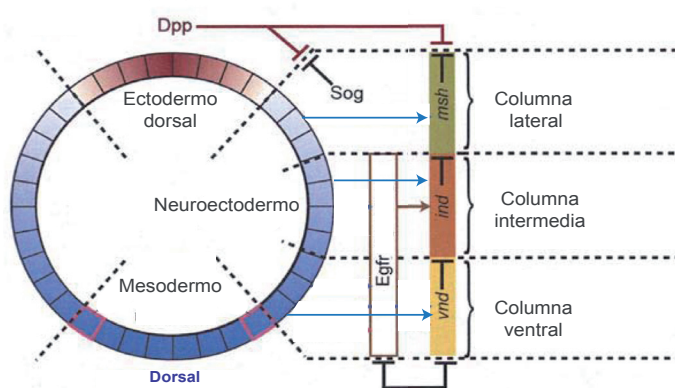
### 5.2.1. Los genes segmentales

El primer paso para la regionalización del eje antero-posterior es la localización diferencial en el huevo de los ARN mensajeros de los denominados genes de efecto materno. Los gradientes de concentración generados por la traducción de ARN mensajeros constituyen una información posicional interpretada por los genes gap lo cuales se expresan en grandes de regiones del embrión parcialmente solapantes. Las diferentes concentraciones de los genes gap controlan la transcripción de los genes de la regla de los pares. Estos últimos dividen el embrión en 7 unidades repetidas que posteriormente serán subdivididas en 14 unidades segmentales por los genes de polaridad segmental (revidado por Gilbert 2006).

La expresión de los genes gap y de la regla de los pares se pierde antes del comienzo de la neurogénesis. No obstante algunos de ellos, como *hunchback* (*hkb*) o *hunchback* (*hb*) vuelven a expresarse más tarde en la CNV con funciones distintas a las de la segmentación (revisado por Bhat, 1999). Por su parte, los genes de polaridad segmental realizan una función central en la especificación de los NBs. Su expresión en filas transversales con respecto a la línea media controla la expresión de los genes proneurales y aseguran que NBs que delaminan en distintas filas dentro de un mismo segmento adquieran distintos destinos (Skeath, 1999). La implicación de estos genes en la especificación de los NBs ha sido principalmente estudiada para las moléculas señalizadoras, Wingless (Wg) y Hedgehog (Hh), el receptor transmembrana Patched (Ptc) y los factores de transcripción Gooseberry (Gsb), Engrailed (En) e Invected (Inv). Todos ellos están implicados tanto en la generación como en la especificación de los NBs (Bhat, 1999). Se ha demostrado por ejemplo, que Wg se expresa en la fila 5 pero se requiere de manera no autónoma para el desarrollo de los NBs de la fila 4 y 6 (Chu-LaGraff y Doe, 1993). Por otra parte, la expresión de Gsb en las filas 5, es necesaria para correcta formación de los NBs presentes esta fila (Skeath, 1995).

### 5.2.2. Los genes columnares

El gradiente de expresión de la proteína Dorsal es la señal principal en la regionalización del eje dorso-ventral. Los niveles altos de expresión de Dorsal nuclear en la región ventral activan la expresión de *snail*, estableciendo así el territorio que dará lugar al mesodermo y delimitando ventralmente la región neuroectodérmica. En el polo opuesto, los niveles altos de expresión Dpp marcan el límite dorsal del NE. Otra señal clave en la regionalización dorso-ventral es la ruta mediada por Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). Esta se activa en los dos tercios más ventrales del NE debido a la expresión localizada de *vein* y *rho*, ligando y mediador transmembrana de la ruta de EGFR respectivamente (von Ohlen y Doe, 2000) (Golembo et al., 1996; Schnepp et al., 1996).



**Fig.I.7. Esquema de las interacciones genéticas que controlan la regionalización del eje dorso-ventral en la CNV**

Sección transversal de un embrión. El límite dorsal de la región neuroectodérmica lo marca la represión de Dpp por Sog. El gradiente nuclear de Dorsal da lugar a la regionalización del NE en tres columnas, ventral (Vnd), intermedia (Ind) y lateral (Msh). Altos niveles de Dorsal dan lugar al mesodermo y niveles algo menores a la expresión de Vnd. Niveles intermedios de Dorsal junto a la ruta de EGFR activan la expresión de Ind. Bajos niveles de Dorsal la controlan la expresión de de Msh. Modificada de Urbach y Technau Urbach y Technau, 2008.

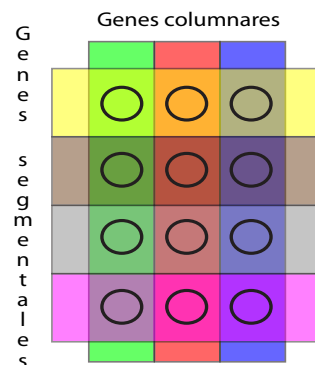
El gradiente de localización nuclear de Dorsal y la ruta mediada por EGFR permiten la división del NE en tres regiones, ventral, intermedia y dorsal, caracterizadas por la expresión de los denominados genes columnares: *vnd*, *ind* y *Msh*. Niveles intermedios de Dorsal activan la expresión de *vnd* pero no *snail*, mientras que niveles aún menores de Dorsal junto a la ruta de EGFR activan la expresión de *ind*. La ausencia de Vnd, Ind y Dpp junto a la expresión de Dorsal a niveles bajos permiten la activación de *Msh*. Finalmente, las represiones de los genes dorsales por los genes inmediatamente más ventrales definen los bordes de cada región o columna de expresión (Skeath, 1998; Zhao et al., 2007) (Fig.I.6).

Vnd e Ind son necesarios para la delaminación y especificación de los NBs de la fila medial e intermedia respectivamente. La falta de función de cada uno de ellos produce una reducción drástica del número de NBs que delaminan en las columnas que definen. Además, los NBs que llegan a formarse adquieren identidades correspondientes a NBs más dorsales. Se produce una transformación de ventral a dorsal. Por otra parte, la expresión ectópica tanto de Vnd como de Ind fuerza a los NBs más dorsales a adquirir destinos correspondientes a NBs ventrales o intermedios en función de cada caso (Chu et al., 1998; McDonald et al., 1998; Skeath et al., 1994; Weiss et al., 1998).



Por su parte, Msh no es necesario para la delaminación de los NBs de la columna dorsal, por lo que su papel como gen columnar es controvertido. Se ha observado que su falta de función induce al menos, la transformación de un NB dorsal a un NB intermedio, a la vez que provoca problemas de proliferación en otros NBs dorsales. Paralelamente su expresión ectópica causa defectos en la diferenciación de los NBs más ventrales (Isshiki et al., 1997).

En resumen, la expresión de los genes segmentales y columnares genera un sistema de coordenadas cartesianas donde cada NB adquiere una identidad propia en función de su lugar de delaminación. Esta identidad se traduce posteriormente en la generación de un linaje único. No obstante, en el caso de los genes columnares queda aún por entender como llevan a cabo su función ya que en algunos NBs su expresión se mantiene a lo largo del desarrollo mientras que en otros se pierde temporalmente (Chu et al., 1998; Isshiki et al., 1997; McDonald et al., 1998; Weiss et al., 1998).



**Fig.I.8. Esquema del sistema de coordenadas generado por la expresión de los genes columnares, en vertical, y los genes segmentales, en horizontal, en el NE embrionario.** El esquema está orientado con la parte anterior arriba

### 5.2.3. Las olas de delaminación

Los genes segmentales y columnares estudiados hasta el momento dividen en el NE de un hemisegmento en 4 filas y 3 columnas, una combinatoria que genera 12 posibilidades. Dado que cada hemineurómero se compone de 30 NBs con identidades únicas, deben de existir otros factores implicados en la especificación de los NBs. Uno de ellos es la dimensión temporal. Los NBs que forman la CNV delaminan en 5 olas sucesivas y su identidad está determinada tanto por su posición como por su momento de delaminación (Doe, 1992) (Fig.I.7). Experimentos de trasplantes heterocrónicos de células neuroectodérmicas pusieron de manifiesto que estas no están comprometidas temporalmente. Células neuroectodérmicas de embriones tempranos son capaces ajustarse a un nuevo entorno generando linajes correspondientes a NBs de delaminación tardía. De igual modo células neuroectodérmicas de embriones tardíos pueden dar lugar a un linaje de un NB de delaminación temprana (Berger et al., 2001).



**Fig.I.9. Olas de delaminación de los NBs**

Esquemas del patrón de NBs que se observan en un hemisegmento derecho de embriones de distintos estadios. En amarillo se señala los NBs que delaminan en el estadio que se indica y en verde lo que lo hicieron en estadios anteriores. La barra negra representa la línea media.

## 5.2.4. Los genes homeóticos

Los mecanismos descritos hasta aquí dan cuenta de la diversidad que existe dentro de un mismo hemisegmento. Sin embargo, NBs homólogos, que delaminan en la misma posición pero en distintos segmentos, no siempre generan el mismo linaje. De hecho, existen tipos neuronales presentes en el tórax y no en el abdomen y viceversa. Los genes homeóticos son los responsables últimos de esta diversidad intersegmental (revisado por Estacio-Gomez y Diaz-Benjumea, 2013; Technau et al., 2006).

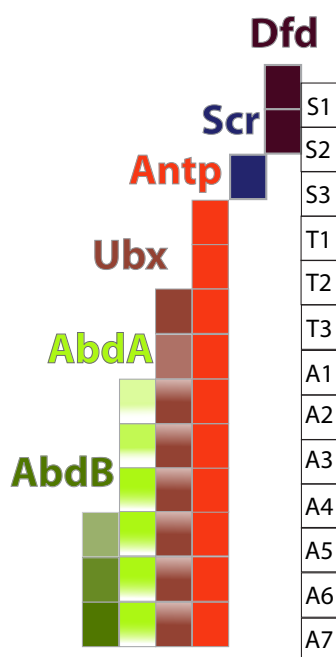
Estos genes, identificados por primera vez en *Drosophila melanogaster*, están conservados a lo largo de la evolución. En los animales bilaterales determinan el desarrollo de las diferentes estructuras en del eje antero-posterior. De este modo, su falta de función provoca transformaciones homeóticas, transformaciones completas de unos segmentos en otros (revisado por McGinnis y Krumlauf, 1992; Carroll, 1995)).

Los genes homeóticos codifican una serie factores de transcripción con un dominio característico en su secuencia denominado homeodominio. Su función principal es dar identidad a las células del segmento en el que se expresan controlando la expresión de múltiples genes dianas, entre los que se encuentran los propios genes homeóticos. Los genes homeóticos que se expresan en dominios más posteriores reprimen la expresión o la función de aquellos que lo hace en dominios anteriores. Es lo

que se conoce como el principio de prevalencia posterior (revisado por (Mallo y Alonso, 2013)). La colaboración con cofactores como Extradenticle (Exd) y Homothorax (Hth) permite aumentar su especificidad a la hora de reconocer sus dianas en el ADN (Mann et al., 2009).

La expresión de los genes homeóticos a lo largo del eje antero-posterior se corresponde con su posición en el genoma donde se agrupan en dos complejos: el complejo Antenapedia (ANT-C) y el complejo Bithorax (BX-C). Este suceso se denomina el principio de colinearidad espacial (revisado por (McGinnis y Krumlauf, 1992)). Los dominios de expresión de los genes homeóticos en la CNV están representados en la Fig.I.10 (Hirth et al., 1998).

En el SNC la expresión de los genes homeóticos no se mantiene por linaje, contrariamente a lo que sucede en otros tejidos como la epidermis (Prokop et al., 1998). Otra particularidad del SNC es que los genes homeóticos desarrollan funciones adicionales a su papel temprano durante el cual dan identidad a distintos territorios en el NE. Los genes homeóticos se expresan en el NE, los NBs y las neuronas controlando distintos procesos como la



**Fig.I.10. Expresión de los genes homeóticos en la CNV**

Representación esquemática de la expresión de los genes homeóticos a lo largo de la CNV. A la izquierda se indica el número de los segmentos.

apoptosis, la proliferación y la especificación celular (revisado por Estacio-Gomez y Diaz-Benjumea, 2013; Technau et al., 2006). Por ejemplo Abd-A y Abd-B controlan el patrón de división del NB 6-4 (Berger et al., 2005), mientras que Abd-A y Ubx se requieren en las neuronas ABLKs para su correcta especificación (Estacio-Gomez et al., 2013).

### 5.3. Especificación de las CMGs: los genes temporales

Los NBs de *Drosophila melanogaster* generan linajes compuestos por una mezcla de destinos neurales: motoneuronas, interneuronas y células gliales; por lo que se les considera células multipotentes. Además, cada NB origina siempre los mismos tipos celulares siguiendo un orden estereotipado. Es la expresión secuencial de genes temporales lo que permiten que neuronas y células gliales de un mismo linaje adopten distintos destinos en función de su momento de generación.

#### 5.3.1. Función de los genes temporales

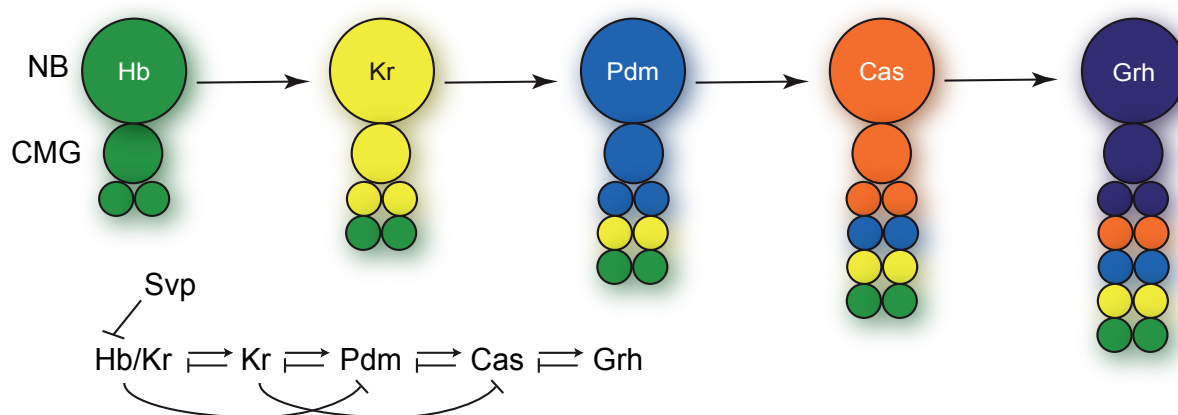
Los genes temporales se expresan en los NBs en el siguiente orden: Hunchback (Hb), Krüppel (Kr), Pdm1 y Pdm2 (Pdm), Castor (Cas) y Grainy-head (Grh) (Baumgardt et al., 2009; Isshiki et al., 2001; Kambadur et al., 1998). Todos ellos codifican factores de transcripción y su secuencia temporal de expresión determina la identidad de los diferentes tipos celulares generados por un mismo NB. Experimentos de falta y ganancia de función demostraron que estos genes son necesarios y suficientes para especificar las células generadas durante su ventana de expresión (Grosskortenhaus et al., 2006; Isshiki et al., 2001; Pearson y Doe, 2003). Una propiedad fundamental de este grupo de genes es que su expresión en distintos NBs da lugar a diferentes destinos. Por ejemplo, la ventana Hb en el NB 4-2 permite especificación de la motoneurona RP2 mientras que en NB 1-1 da lugar a las neuronas aCC (anterior Corner Cell) y pCC (posterior Corner Cell) (Isshiki et al., 2001). Los genes temporales son por tanto un elemento más que junto con los genes segmentales, columnares y homeóticos, participan en la especificación neural.

Una vez expresados en los NBs, los genes temporales son heredados por las CMGs y posteriormente por las dos células generadas por cada una de ellas. La expresión ectópica de los genes temporales en las neuronas no altera su destino de lo que se deduce que la competencia para responder a la expresión de estos genes está temporalmente restringida (Pearson y Doe, 2003). Asimismo, la competencia de los NBs para responder a un gen temporal disminuye a lo largo del desarrollo (Cleary y Doe, 2006; Pearson y Doe, 2003). En el caso de Hb esto se debe a una reorganización del genoma (Kohwi et al., 2013).

#### 5.3.2. Regulación de la expresión de los genes temporales

Independientemente de su momento de delaminación, cada NB expresa invariablemente la misma secuencia de genes temporales. Sin embargo, no todos empiezan por la ventana Hb ni ter-

minan por la ventana Grh. NBs cultivados *in vitro* también expresan los distintos genes temporales (Grosskortenhaus et al., 2005; Isshiki et al., 2001). Estas observaciones demuestran que la activación de estos genes es independiente de señales extrínsecas. Experimentos de pérdida y ganancia de función revelaron que cada gen temporal activa la expresión del gen siguiente, a la vez que reprime la expresión del gen siguiente más uno y la del gen anterior (Baumgardt et al., 2009; Cleary y Doe, 2006; Grosskortenhaus et al., 2006; Isshiki et al., 2001; Kambadur et al., 1998; Maurange et al., 2008; Tran y Doe, 2008).



**Fig.I.11. Los genes temporales.**

Expresión secuencial de los genes temporales en un linaje modelo. En la parte baja de la imagen se muestra un esquema de las regulaciones genéticas que existen entre los distintos genes temporales.

A pesar de su robustez, este modelo de regulación interna no explica todos los fenotipos observados. Por un lado la pérdida de función de Hb, Kr y Pdm tienen un efecto menor en la progresión de la serie de factores temporales (Grosskortenhaus et al., 2006; Isshiki et al., 2001). Esto indica que deben existir factores adicionales que aseguren la activación de *Kr*, *pdm* y *cas*. Por otra parte, la duración de las diferentes ventanas temporales y con ello el número de células que originan en cada una de ellas es distinta en cada NB. Durante la ventana Hb, el NB 7-3 da lugar a dos neuronas, mientras que durante la misma ventana el NB 5-6 genera 6 células (Baumgardt et al., 2009; Isshiki et al., 2001). Se desconocen los mecanismos genéticos que dan cuenta de esta variabilidad. Por último, ningún gen temporal reprime la expresión de *hb*. Se ha descrito que el encargado de cerrar esta ventana temporal es el receptor nuclear sin ligando conocido Seven-up (Svp). A pesar de que *svp* se transcribe desde muy temprano en los NBs, para que su traducción sea efectiva requiere una división mitótica. De esta forma, el ARN mensajero se libera en el citoplasma y los niveles de proteína Svp alcanzan el umbral suficiente para reprimir la expresión de *hb* (Kanai et al., 2005; Mettler et al., 2006).

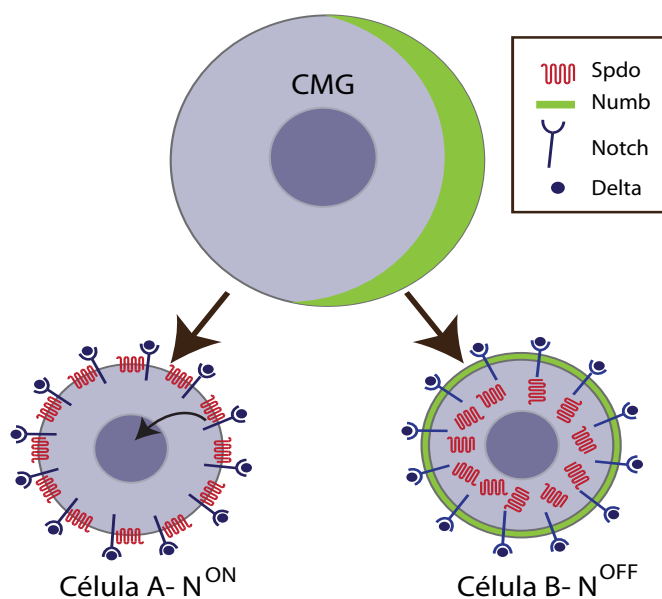
El modelo de los genes temporales explica en gran medida la diversidad existente dentro de un mismo linaje. Sin embargo, teniendo en cuenta que durante algunas ventanas temporales se generan varios destinos neurales, queda por resolver cómo se subdividen las ventanas temporales de manera que cada CMG adquiera una identidad única. En el caso del NB 5-6, se ha descrito que un

complejo mecanismo de regulación génica que involucra a los genes *nab*, *sqz* y *svp* genera subventanas temporales dentro de la ventana temporal Cas (Baumgardt et al., 2009; Benito-Sipos et al., 2011).

## 5.4. Especificación de las células hermanas: la ruta de Notch

El último paso de la neurogénesis es la división de las CMGs para producir un par de células hermanas. En la mayoría de los casos estas dos células difieren tanto en la expresión génica como en las proyecciones axonales que generan. La activación de la ruta de Notch en una de ellas, célula A y la inactivación en su célula hermana, célula B, permite que cada una adquiera un destino diferente. La progenie de un NB se puede dividir por tanto en dos hemilíneas, A y B (Truman et al. 2010). La interacción mediada por Notch entre las células hermanas es posible gracias a la distribución asimétrica de la proteína transmembrana Numb (Lundell et al., 2003; Skeath y Doe, 1998; Udolph et al., 2009). Tras la división asimétrica de la CMG, solo la célula B hereda la proteína Numb, la cual desplaza a Sanpodo (Spdo) de la membrana de modo que Spdo se localiza en la membrana de la célula A y en el citoplasma de la célula B (Fig.I.9). *spdo* codifica una proteína transmembrana implicada en la transducción de la señal de Notch durante las divisiones asimétricas. Su función consiste en acentuar las diferencias entre los niveles de señalización por Notch entre las dos células hermanas, amplificándolos en la célula A y fortaleciendo su represión en la célula B. De esta forma Spdo permite que los niveles de señalización difieran lo suficiente como para que cada célula adopte un destino distinto (Babaoglan et al., 2009) (O'Connor-Giles y Skeath, 2003).

Es importante señalar que la activación de la ruta de Notch al igual que su silenciamiento da lugar a diversos destinos dependiendo del contexto. Por ejemplo, en el linaje del NB 7-3, algunas neuronas A mueren por apoptosis mientras que otras se diferencian como motoneuronas (Lundell et al., 2003).



**Fig.I.12. División asimétrica de la CMG y la ruta de Notch**

Esquema de la división asimétrica de una CMG. Una de las dos células generadas, la célula B, hereda la proteína Numb, lo que provoca la deslocalización de Spdo de la membrana citoplasmática y por lo tanto dificulta la traducción de la señal de la ruta de Notch. La otra célula, la célula A, al no heredar Numb, mantiene Spdo en la membrana y responde a la activación de la ruta.

## 6. Las neuronas CCAP/Bursicón como modelo experimental para el estudio de los mecanismos de especificación neuronal

### 6.1. Análisis de la diferenciación de un destino neuronal como modelo de estudio

Los procesos anteriormente descritos dan cuenta de cómo cada NB adquiere una identidad única dentro del grupo de 30 NBs que delaminan por hemisegmento, cómo las CMGs generadas por un mismo NB se diferencian unas de otras, y por último, como las dos células procedentes de una misma CMG adquieren destinos distintos. Sin embargo, estos tres mecanismos por sí solos no dan cuenta de toda la diversidad presente en la CNV, dado que no explican, por ejemplo cómo se generan diferentes destinos dentro de una misma ventana. Tampoco esclarecen cómo se controla temporalmente la diferenciación terminal de las neuronas. Esto tiene especial importancia en especies polifénicas como *Drosophila melanogaster*, en las que neuronas generadas durante la embriogénesis adquieren su diferenciación terminal en la fase de pupa satisfaciendo así los requerimientos fisiológicos o de comportamiento del individuo adulto (Veverytsa y Allan, 2012).

Los estudios anteriormente citados revelan que las neuronas se especifican por la acción secuencial y combinatorial de genes reguladores y rutas de señalización, y no como consecuencia de la activación de un único gen. No obstante, se desconoce cómo los mecanismos de especificación se integran para dar finalmente un tipo celular completamente diferenciado; cómo, por ejemplo, la información dada por los genes temporales o la ruta de Notch se interpreta en función de la identidad adquirida por el NB en el momento de su delaminación.

Una aproximación para tratar de resolver estos interrogantes es estudiar cómo se genera un tipo neuronal funcional. Las neuronas diferenciadas se clasifican según el patrón de axonación que presentan, las conexiones que realizan y los neurotransmisores y los neuropéptidos que liberan. Un modelo para el estudio de la especificación neuronal son las neuronas neuropeptidérgicas ya que de las 10,000 células que se estima que posee la CNV de *Drosophila melanogaster* tan solo 200 expresan algún neuropéptido (Park et al., 2008). Los neuropéptidos son pequeñas moléculas que normalmente se secretan en la hemolinfa actuando como hormonas. Su expresión es altamente estereotipada y fácilmente reconocible mediante inmunomarcaje por lo que son una herramienta de gran utilidad para identificar un tipo neuronal diferenciado.

### 6.2. Las neuropéptidos CCAP y Bursicón

En esta tesis trabajamos con los neuropéptidos Crustacean cardioactive peptide (CCAP) y Bursicón. Ambos están presentes en un gran número de artrópodos y juegan un papel fundamental en el desarrollo de la ecdisis (revisado por White y Ewer, 2014). En *Drosophila melanogaster* fueron identificados por primera vez por Ewer *et al.* (Ewer y Truman, 1996) y Dewey *et al.* (Dewey et al., 2004)



respectivamente. Ambos neuropéptidos se expresan en un conjunto discreto de neuronas de la CNV que denominamos neuronas CCAP/Bursicón. La pérdida de función conjunta de CCAP y Bursicón provoca defectos en la eversión de la cabeza y comportamientos aberrantes durante la ecdisis pupal (Park et al., 2003; Larh et al. 2012). Mientras que la pérdida únicamente de Bursicón evita la expansión de las alas así como el endurecimiento y la pigmentación de la cutícula (Dewey et al., 2004; Lahr et al., 2012). Para llevar a cabo estas funciones Bursicón forma heterodímeros con “Partner of Bursicon” (Luo et al. 2005, Lahr et al. 2012). Se ha observado que la expresión de CCAP y Bursicón varía a lo largo del desarrollo de la mosca; el número de neuronas CCAP/Bursicón incrementa entre larva de tercer estadio y pupa y se pierde por completo 24 horas después de la eclosión de la pupa (Draizen et al., 1999 ; Dewey et al., 2004; Larh 2012 et al. ; Veverytsa y Allan, 2012).

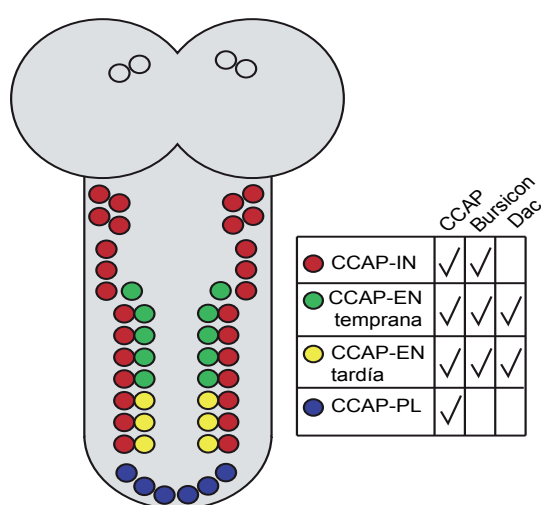
### 6.3. Las neuronas CCAP/Bursicón

Las neuronas CCAP/Bursicón conforman un grupo heterogéneo de células que difieren en los neuropéptidos y marcadores que expresan, en el momento que alcanzan su diferenciación terminal y en la axonación que presentan. Existen distintas clasificaciones atendiendo a la descripción de diferentes autores. Veverytsa y Allan (Veverysa y Allan, 2012) clasifican las neuronas CCAP/Bursicón en cuatro grupos (Fig.I.10).

- El primer grupo corresponde a las interneuronas (CCAP-INs). Estas neuronas se distinguen del resto de neuronas CCAP/Bursicón por no expresar el gen *dacshund* (*dac*) y por emitir proyecciones axonales en el interior del SNC. Tanto en larva de tercer estadio como en pupa, hay 4 interneuronas en los hemisegmentos subesófagicos y una en cada uno de los hemisegmentos desde el T1 hasta el A7.
- El segundo grupo lo componen las neuronas eferentes tempranas (CCAP-NEs tempranas). Las proyecciones axonales de estas neuronas salen del SNC a través de los nervios segmentales, además, desde larva de tercer estadio, pueden identificarse por la expresión de *Dac*, CCAP y Bursicón. Existe una única CCAP-NEs temprana por cada hemisegmento, desde el T3 hasta el A4.
- Las neuronas eferentes tardías (CCAP-NEs tardías) conforman el tercer grupo y se distinguen de las anteriores por su retraso en la expresión de CCAP y Bursicón. En estas células los neuropéptidos no se detectan hasta el estadio de pupa. Hay una CCAP-NE tardía por cada hemisegmento desde el A5 al A7.
- El último grupo es el de las CCAP terminales (CCAP-PLs). Estas neuronas, al igual que las CCAP-NEs tardías empiezan a expresar CCAP en el estadio pupal, sin embargo no expresan Bursicón. Se pueden indentificar tres CCAP-PLs en la parte final de la cuerda nerviosa ventral, formada por los segmentos A8, A9 y A10.

Si bien las diferentes clases de neuronas CCAP/Bursicón activan la expresión de los neuropéptidos en distintos momentos del desarrollo, estos autores demuestran que todas ellas se generan

durante la neurogénesis embrionaria. Varios autores describen el mismo patrón de expresión para estos neuropéptidos en tercer estadio larvario, (Dewey et al., 2004; Ewer y Truman, 1996; Park et al., 2003; Veveritysa y Allan, 2011). Sin embargo, existe cierta controversia en el patrón de expresión de CCAP y Bursicón en el estadio de pupa. Según varios autores, todas las neuronas CCAP positivas del T3 al A7 expresan Bursicón, (Veveritysa y Allan, 2012; Lahr et al., 2012). No obstante, otro grupo señala que en los segmentos T3-A7 solo una neurona de cada par expresa Bursicón (Luan et al., 2006; Peabody, et al. 2008). Atendiendo a los segmentos finales, algunos autores señalan la existencia de un par de células CCAP/Bursicón en el A8 (Lahr et al., 2012; Luan et al., 2006), mientras que otros identifican tres pares en el conjunto de segmentos A8/A9 (Veveritysa y Allan, 2012) únicamente positivas para CCAP. Las diferencias en los patrones de expresión descritos se deben posiblemente a la diferente sensibilidad de los anticuerpos utilizados en cada trabajo y al momento preciso de la observación.



**Fig.I.13. Patrón de neuronas CCAP/Bursicón en el SNC de una pupa**

Esquema de los cuatro tipos de neuronas CCAP/Bursicón descritas por Veveritysa et al. (Veveritysa and Allan, 2012). A la izquierda se muestran los neuropéptidos y marcadores expresados por cada tipo celular.

White *et al* proponen otra clasificación, basada en criterios funcionales. Estos autores distinguen las neuronas Bursicón positivas subesofágicas  $B_{SEG}$ , y las abdominales,  $B_{AG}$ . Observan que la proyecciones axonales de las  $B_{SEG}$  se expanden por toda la CNV mientras que las de las  $B_{AG}$  se dirigen a la hemolinfa. Constatan también que la falta de función del receptor de Bursicón, codificado por el gen *rickerts*, impide la liberación de Bursicón por las  $B_{AG}$  pero no por las  $B_{SEG}$ . Estos resultados les llevan a plantear la existencia de una red funcional según la cual la liberación de Bursicón por parte de las  $B_{SEG}$  activa las  $B_{AG}$ , lo que hace que estas liberen Bursicón a la hemolinfa (Luan et al., 2006; Peabody et al., 2008).

En suma, la expresión de CCAP y Bursicón permite la identificación de varios tipos celulares, los cuales aparecen en diferentes segmentos y terminan de diferenciarse en distintos momentos del desarrollo. Estas diferencias espaciales y temporales hacen de las neuronas CCAP/Bursicón un buen modelo a la hora de estudiar los mecanismos de especificación neural.







# Objetivos

---



El propósito de esta tesis ha sido estudiar los mecanismos por los que se establece la gran diversidad de tipos celulares presentes en el SNC de *Drosophila melanogaster*. Con este fin, nos propusimos analizar los mecanismos genéticos y moleculares implicados en la especificación de las neuronas CCAP/Bursicón y nos planteamos los siguientes objetivos:

- Estudiar el patrón de expresión de los péptidos CCAP y Bursicón en embriones y larvas de *Drosophila melanogaster*
- Identificar el NB progenitor de las neuronas CCAP/Bursicón y analizar su linaje
- Estudiar el papel de los genes homeóticos en la adquisición del destino CCAP/Bursicón
- Identificar la ventana temporal en la que se originan las células CCAP/Bursicón
- Estudiar el papel de la ruta de Notch en la generación del destino CCAP/Bursicón
- Identificar y caracterizar genes implicados en la generación y especificación de las células CCAP/Bursicón



# Materiales y Métodos

---





# 1. Estirpes de *Drosophila melanogaster* utilizadas

Las estirpes de *Drosophila melanogaster* se cultivaron en condiciones estándar de temperatura y humedad (23-25°C y 60% de humedad). La mayor parte de las líneas usadas en este trabajo están descritas en Flybase (Drysdale and FlyBase, 2008), en caso contrario se adjunta la referencia correspondiente. A menos que se indique, las moscas se obtuvieron de Bloomington *Drosophila* Stock Center. En el caso de las deficiencias se indica entre paréntesis el gen de interés que es eliminado. En este trabajo se utilizaron las siguientes estirpes:

Líneas mutantes: *ab<sup>1D</sup>*, *ac<sup>Hw-49c</sup>*, *abd-A<sup>M1</sup>* (Sanchez-Herrero et al., 1985), *Abd-B<sup>M1</sup>* (proporcionada por E.Sánchez-Herrero, CBM, Madrid, España), *Abd-B<sup>M5</sup>* (proporcionada por E.Sánchez-Herrero, CBM, Madrid, España), *Antp<sup>14</sup>* (Lewis et al., 1980), *ap<sup>P44</sup>* (proporcionada por S.Thor, Linköping University, Linköping, Suecia), *asp<sup>1</sup>*, *Awb<sup>63Ed-G14</sup>*, *bowl<sup>l</sup>*, *caps<sup>65.2</sup>*, *cas<sup>D1</sup>* (proporcionada por M.Baumgardt, Linköping University, Linköping, Suecia), *Chip<sup>65.5</sup>* (Pueyo and Couso, 2004) (proporcionada por J.P. Couso, University of Sussex, Brighton, UK), *col<sup>l</sup>* (proporcionada por S.Thor), *crol<sup>04418</sup>*, *da<sup>1</sup>*, *dac<sup>4</sup>* (Mardon et al., 1994), *Df(1)ED7294* (*germ-cell expressed bHLH-PAS*), *Df(2R)BSC272* (*DP transcription factor*), *Df(2R)BSC303* (*gemini*), *Df(2R)BSC350* (*gemini*), *Df(2L)ED773* (*pdm1 y pdm2*), *Df(2R)Exel3071* (*homeobrain*), *Df(2R)Exel6283* (*espinas*), *Df(2R)Exel7135* (*charlatan*), *Df(2R)Exel7166* (*homeobrain*), *Df(3R)BSC493* (*forkhead domain 96Cb*), *Df(3R)BSC679* (*forkhead domain 96Cb*), *Df(3R)Exel8154* (*Fer3*), *Df(3R)Exel7309* (*Fer3*), *Df(3L)H99*, *Df(3L)H99 Ubx<sup>6.28</sup>*, *Df(3L)H99 spdo<sup>G104</sup>*, *Df(3L)H99 ems<sup>1</sup>*, *Dfd<sup>1</sup>*, *dsf<sup>f00109</sup>*, *EcR<sup>Q50st</sup>*, *EcR<sup>k06210</sup>*, *EcR<sup>112</sup>*, *elB<sup>3.3.1</sup>* *noc<sup>D64</sup>*, *ems<sup>1</sup>*, *esg<sup>35Ce-1</sup>* (Whiteley et al., 1992) (proporcionada por Y.Hayashi, Tohoku University, Sendai, Japan), *esn<sup>f00447</sup>*, *exex<sup>2KK30</sup>* *ey<sup>2</sup>*, *eya<sup>10</sup>*, *eya<sup>cl-11D</sup>*, *fkh<sup>1</sup>*, *gsb<sup>IIIX62</sup>*, *grn<sup>7L</sup>*, *grh<sup>IM</sup>*, *gt<sup>E6</sup>*, *hb<sup>P1</sup>* *hb<sup>FB</sup>* (*hb<sup>FB</sup>* es un alelo nulo de *hb* y *hb<sup>P1</sup>* un transgen que permite la expresión de *hb* en el ectodermo . Por lo tanto esta combinación genética elimina específicamente Hb en el SNC (Isshiki et al., 2001)) (proporcionada por C.Q.Doe, University of Oregon, Eugene, E.E.U.U.), *Hey<sup>06656</sup>*, *hkb<sup>2</sup>*, *hkb<sup>A321R1</sup>*, *Hsf<sup>1</sup>*, *ind<sup>l6.2</sup>* (proporcionada por O.Vef, Institut für Genetik, Mainz, Alemania), *isl<sup>l</sup>*, *jing<sup>01094</sup>*, *jing<sup>22F3</sup>* (Culi et al., 2006) (proporcionada por J.Culí, CABD, Sevilla, España), *jumu<sup>06439</sup>*, *ken<sup>02970</sup>*, *klu<sup>212IR51C</sup>* (Yang et al., 1997) (proporcionada por W.Chia, Temasek Life Science Laboratory, National University of Singapore, Singapore), *Kr<sup>l</sup>* *Kr<sup>CD</sup>* (*Kr<sup>l</sup>* es un alelo nulo de *Kr* y *Kr<sup>CD</sup>* un transgen que rescata la expresión de *Kr* en el ectodermo. Por lo tanto esta combinación genética elimina Kr en el SNC (Isshiki et al., 2001)) (proporcionada por C.Q.Doe), *Kr-h1<sup>EP2884</sup>*, *lab<sup>4</sup>*, *Lim3<sup>2</sup>*, *lz<sup>15</sup>*, *mirr<sup>SaiD3</sup>*, *mld<sup>P2</sup>*, *Msh<sup>D68</sup>* (proporcionada por O.Vef), *mor<sup>1</sup>*, *nab<sup>SH143</sup>*, *nab<sup>R52</sup>* (Terriente Felix et al., 2007), *Nkx6<sup>D25</sup>* (Broihier et al., 2004) (proporcionada por R.Urbach, Institut für Genetik, Mainz, Alemania), *numb<sup>1</sup>*, *odd<sup>01863</sup>*, *osa<sup>2</sup>*, *pb<sup>10</sup>*, *pnr<sup>xxx6</sup>*, *pnr<sup>xxx1</sup>* (Romain et al., 1993) (proporcionada por M.Baumgardt), *rn<sup>20</sup>* (St Pierre et al., 2002), *rpr<sup>XR38</sup>* (White et al., 1994) (proporcionada por K.White, Harvard Medical School, Charlestown, E.E.U.U.), *rtn<sup>1</sup>*, *Scr<sup>4</sup>*, *slp1<sup>1</sup>*, *slp1<sup>2</sup>*, *spdo<sup>G104</sup>*, *stc<sup>05441</sup>*, *svp<sup>1</sup>* (proporcionada por A.Gould, MRC National Institute for Medical Research, London, UK), *tll<sup>l</sup>*, *tsh<sup>8</sup>*, *toy<sup>hd1</sup>*, *Ubx<sup>6.28</sup>* (Beachy et al., 1985) (proporcionada por E.Sánchez-Herrero), *Ubx<sup>l</sup>* *abd-A<sup>P24</sup>* (proporcionada por E.Sánchez-Herrero), *Ubx<sup>MX6</sup>* *abd-A<sup>M1</sup>* *Abd-B<sup>D18</sup>* (proporcionada por E.Sánchez-Herrero), *vn<sup>10567</sup>*, *vnd<sup>6</sup>*, *wor<sup>1</sup>*, *yw*, *zfh1<sup>00865</sup>*.

Deficiencias Zinn: *Df(2L)net-PMF*, *Df(2L)BSC106*, *Df(2L)BSC4*, *Df(2L)BSC16*, *Df(2L)BSC37*, *Df(2L)dpp[d14]*, *Df(2L)JS17*, *Df(2L)BSC28*, *Df(2L)BSC31*, *Df(2L)ED250*, *Df(2L)BSC109*, *Df(2L)Exel6011*, *Df(2L)BSC169*, *Df(2L)Exel6013*, *Df(2L)ED347*, *Df(2L)Exel6015*, *Df(2L)Exel9038*, *Df(2L)Dwee1-W05*, *Df(2L)Exel7029*, *Df(2L)ED438*, *Df(2L)Exel7031*, *Df(2L)ED499*, *Df(2L)Trf-C6R31*, *Df(2L)BSC111*, *Df(2L)Exel7038*, *Df(2L)BSC215*, *Df(2L)BSC143*, *Df(2L)Exel7048*, *Df(2L)ED746*, *Df(2L)BSC36*, *Df(2L)FCK-20*, *Df(2L)TE35BC-24*, *Df(2L)Exel6038*, *Df(2L)Exel7066*, *Df(2L)Exel8036*, *Df(2L)BSC148*, *Df(2L)BSC256*, *Df(2L)Exel6045*, *Df(2L)ED1317*, *Df(2L)Exel7080*, *Df(2L)Exel6047*, *Df(2L)Exel6048*, *Df(2L)ED1466*, *Df(2L)Exel6049*, *Df(2L)BSC151*, *Df(2L)C'*, *Df(2R)Nipped-D*, *Df(2R)Exel7092*, *Df(2R)w45-30n*, *Df(2R)BSC132*, *Df(2R)BSC303*, *Df(2R)BSC281*, *Df(2R)Exel7124*, *Df(2R)Exel7131*, *Df(2R)Exel7135*, *Df(2R)Exel6063*, *Df(2R)Exel7142*, *Df(2R)BSC161*, *Df(2R)BSC355*, *Df(2R)Exel7150*, *Df(2R)ED3923*, *Df(2R)Exel6082*, *Df(2R)Px2*. Se seleccionaron estas deficiencias ya que embriones homocigóticos portadores sobreviven en hasta estadio 16 (Wright et al. 2010)

Líneas lacZ: *gsb<sup>01155</sup>-lacZ* (proporcionada por S.Thor), *hkb<sup>5953</sup>-lacZ*, *ind-lacZ* (proporcionada por O.Vef), *mirr-lacZ* (proporcionada por S.Campuzano, CBM, Madrid, España), *Msh-lacZ* (proporcionada por O.Vef), *vnd-lacZ* (proporcionada por O.Vef).

Líneas Gal-4/Gal-80: *CCAP-Gal4* (Park et al., 2003) (proporcionada por J. Ewer, Centro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso, Valparaíso, Chile), *eg<sup>MZ360</sup>-Gal4* (proporcionada por B. Condrón, University of Virginia, Charlottesville, E.E.U.U.), *elB-Gal4*, *ems-Gal4* (generada en este trabajo), *ems-Gal4 tub-Gal80<sup>s</sup>*, *elav-Gal4<sup>C155</sup>*, *elav-Gal4<sup>C155</sup> tub-Gal80<sup>s</sup>*, *elav-Gal4<sup>C155</sup> UAS-dicer*, *Hb:HG4-6GFP* (Hirono et al., 2012)(proporcionada por C.Q.Doe), *insc-Gal4*, *sca-Gal4* en el cromosoma II y III (Isshiki et al., 2001) (proporcionada por C.Q.Doe), *wor-Gal4* (Lee et al., 2006) (proporcionada por C.Q.Doe).

Líneas UAS: *UAS-abd-A<sup>20-10-1</sup>* (Michelson, 1994) (proporcionada por E. Sánchez-Herrero), *UAS-Abd-B<sup>m2SG19</sup>* (Castelli-Gair et al., 1994)(proporcionada por E. Sánchez-Herrero), *UAS-Abd-B-RNAi<sup>12024</sup>* (VDRC), *UAS-Antp* (Hirth et al., 2001) (proporcionada por E. Sánchez-Herrero), *UAS-β-Galactosidasa*, *UAS-cas* en el cromosoma II y III (Kambadur et al., 1998) (proporcionada por M. Baumgardt), *UAS-Dfd<sup>W4</sup>*, *UAS-elB<sup>EP2039</sup>* (Dorfman et al., 2002) (proporcionada por B.Shilo, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel), *UAS-ems<sup>15B</sup>* (proporcionada por J. Hombría, CABD, Sevilla, España), *UAS-flp Act>stop>β-Galactosidasa*, *UAS-GFP*, *UAS-grh<sup>15M</sup>* (Baumgardt et al., 2007) (proporcionada por M. Baumgardt), *UAS-hb<sup>F4A</sup>*, *UAS-Hey<sup>1315</sup>* (Monastirioti et al., 2010) (proporcionada por B. Sanz-Juan), *UAS-ind* (proporcionada por O.Vef), *UAS-isl* (proporcionada por S. Thor), *UAS-Kr*, *UAS-lab*, *UAS-mam<sup>DN</sup>* (proporcionada por M. Millan, Imperial College of London, London, UK), *UAS-Msh<sup>m25-m6</sup>* (proporcionada por O.Vef), *UAS-Nintra*, *UAS-pb*, *UAS-pdm* (Grosskortenhaus et al., 2006) (proporcionada por C.Q.Doe), *UAS-p35*, *UAS-Scr*, *UAS-tsh* (proporcionada por H.Skaer, Cornell University, Ithaca, E.E.U.U.), *UAS-Ubx<sup>IAI</sup>* (Castelli-Gair et al., 1994) (propor-

cionada por E. Sánchez-Herrero), *UAS-zfh2-RNAi* (Terriente et al., 2008), *UAS-vnd* (proporcionada por O.Vef).

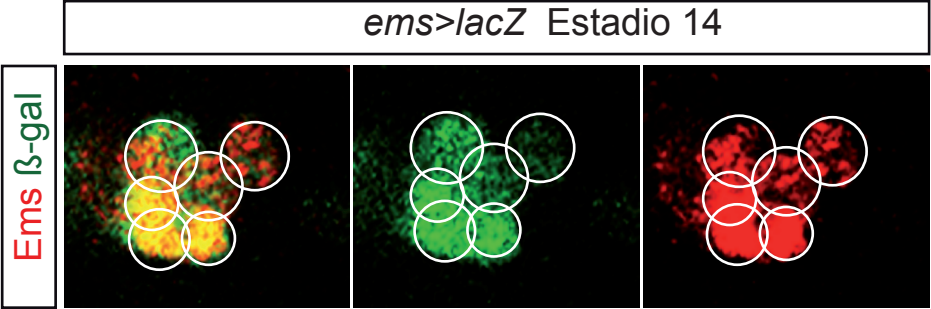
Para mantener las líneas mutantes se utilizaron los siguientes cromosomas balanceadores: *FM7 Act-GFP*; *CyO, Act-GFP*; *CyO, Dfd-EYFP*; *CyO, twi-Gal4 UAS-GFP*; *TM3, Ser Act-GFP*; *TM3, Sb Ser twi-Gal4, UAS-GFP*; o *TM6, Sb, Tb, Dfd-EYFP*. Los embriones mutantes se identificaron por la ausencia de expresión de GFP. Como cepa de referencia se utilizó CantonS.

## 2. Generación de la línea *ems-Gal4*

Hartman et al. (Hartmann et al., 2000) describen que la región reguladora de *ems* que controla su expresión en el SNC se encuentra en las 8kb adyacentes al ADN que contiene la secuencia codificante del gen. Para generar la línea *ems-Gal4* se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la región de 7kb adyacente a la secuencia de *ems* utilizando una temperatura de anillamiento de 62°C y los siguientes oligonucleótidos cebadores:

5'-cca gac aga act cca tac tcc acc c-3'  
 5'-gtg tag tat ggc cgt ctt ctt tgc gc-3'

La amplificación se realizó a partir de ADN extraído de moscas silvestres siguiendo el protocolo descrito en [www.fruitfly.org/about/methods/inverse.pcr.html](http://www.fruitfly.org/about/methods/inverse.pcr.html). El producto de PCR se ligó en el vector comercial PGem-T Easy (Promega). Posteriormente se cortó el plásmido PGem-T Easy con el inserto con la enzima de digestión Not1. Paralelamente se digirió el plásmido PPT-Gal4 (Housden et al., 2012) con la misma enzima y se desfosforiló para evitar la religación. Se ligó el fragmento de interés dentro del plásmido PPT-Gal4 y se comprobó por secuenciación el resultado final. Las reacciones de digestión, ligación y transformación se realizaron según los protocolos descritos en Green, 2012. El servicio de transgénesis del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO) transformó embriones *yw* con el vector final mediante microinyección. Se comprobó que la construcción funcionaba correctamente cruzado moscas *ems-Gal4* con moscas *UAS-LacZ* y tiñendo los embriones resultantes del cruce con los anticuerpos  $\alpha$ - $\beta$ -galactosidasa,  $\alpha$ -Ems (Fig.M.1). Se observó colocalización entre ambas proteínas.

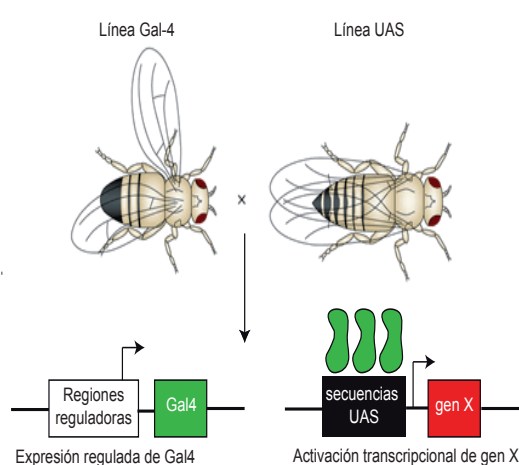


**M.1. Expresión de *ems-Gal4***  
 Expresión de  $\beta$ -galactosidasa (verde) y Ems (rojo) en un hemineurómero de un embrión de estadio 14 *ems-Gal4 UAS- $\beta$ -galactosidasa* crecido a 29°. Se observa coexpresión de ambas proteínas.

### 3. Sistema Gal4/UAS

#### 3.1. Descripción del sistema

El sistema procedente de levaduras Gal4/ UAS (Brand and Perrimon, 1993) permite activar la expresión de transgenes de forma controlada en el tiempo y en el espacio. El sistema requiere dos líneas transgénicas, la primera expresa la proteína Gal4 en un patrón determinado por las regiones reguladoras adyacentes y la segunda posee el ADN codificante del gen que se quiere expresar ectópicamente bajo el control de las secuencias reguladora UAS. Las secuencias UAS son reconocidas por la proteína Gal4, de manera que cruzando ambas cepas se obtiene una descendencia que expresa el transgén de interés en el patrón espacial y temporal de la línea Gal4 utilizada (Fig.M.2).



#### M.2. Sistema Gal4/UAS

Esquema del sistema de expresión génica dirigida Gal4/UAS. La unión de la proteína Gal4 a las secuencias reguladoras UAS activa la expresión del gen de interés (gen X). Para que esto suceda deben cruzarse dos líneas de moscas, una de ellas expresará la proteína Gal4 bajo el control de unas secuencias reguladoras específicas, y la otra tendrá las secuencias UAS adyacentes al ADN codificantes del gen de interés. Modificada de St Johnston (St Johnston, 2002).

Para un mayor control del sistema se puede hacer uso de la proteína Gal80, también procedente de levaduras. Esta proteína se une a la proteína Gal4 impidiendo así la activación de las secuencias UAS. Existe una variante termosensible de la proteína Gal80 bajo el control del promotor de la tubulina (*tub-Gal80<sup>ts</sup>*) (McGuire et al., 2003). Cuando estas moscas se incuban a 30°C, la proteína Gal80<sup>ts</sup> se inactiva y la proteína Gal4 realiza su función. Por el contrario, si las moscas se mantienen a 17°C, la proteína Gal80<sup>ts</sup> impide que la proteína Gal4 active las secuencias UAS. De esta forma la activación del sistema Gal4/UAS puede ser controlada temporalmente.

#### 3.2. Determinación de la secuencia de aparición de las neuronas CCAP/Bursicón

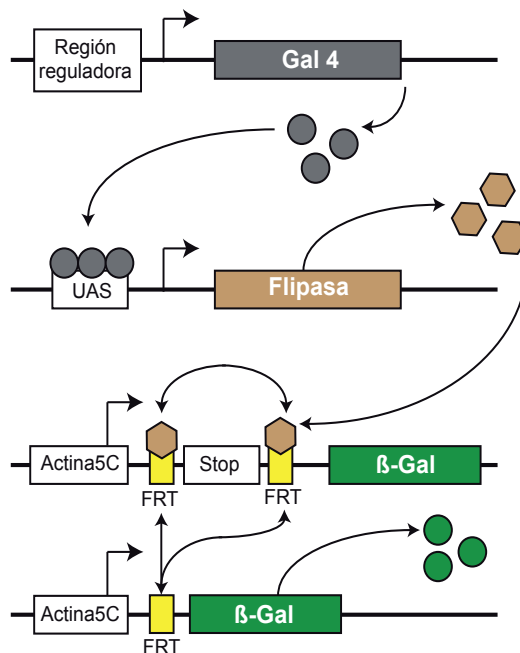
Haciendo uso de este sistema se determinó el orden de generación de las neuronas CCAP/Bursicón. Se recogieron embriones *elav-Gal4 tub-Gal80<sup>ts</sup> UAS-GFP* durante dos horas y se permitió que se desarrollasen a 29°C durante 3 horas. Durante ese tiempo, el gen reportero *GFP* pudo ser activado por la proteína Gal4, al estar inactiva la proteína Gal80<sup>ts</sup>. A continuación, se pasaron los embriones a 17°C con el fin de inactivar la línea Gal4 e impedir la expresión de GFP. Cuando los embriones alcanzaron el estadio 17 se les sometió al protocolo de tinciones inmunohistoquímicas explicado más adelante.

## 4. Experimentos de Flip-out

### 4.1. Sistema Flp/FRT

En este sistema, la proteína Flipasa (Flp), una recombinasa procedente de levaduras reconoce las secuencias “Flippase Recognition Target” (FRT) y promueve la recombinación entre ellas. Esto resulta en la escisión del fragmento de ADN flanqueado por las regiones FRT.

En este trabajo se utilizó una construcción que contiene el promotor ubicuo *Actina5C* separado de la secuencia del gen reportero *lac-Z* por un cassette flip-out. El cassette se compone de un espaciador génico (CD2), caracterizado por poseer una secuencia de parada de lectura, flanqueado por dos secuencias FRT. La expresión de la FLP (*UAS-FLP*) se activó con una línea Gal4 (*elav-Gal4* o *ems-Gal4*). Una vez que se produjo la recombinación, la expresión de *lac-Z* pasó a depender del promotor de expresión ubicua *Actina5C*, por lo que se mantuvo de forma permanente en la célula.



#### M.3. Esquema de los experimentos de Flip-out

La proteína Gal4 activa la expresión de la Flipasa al unirse a las secuencias adyacentes UAS. A su vez la Flipasa promueve la recombinación homóloga entre las secuencias FRT, lo que elimina el cassette STOP y permite la expresión de β-galactosidasa bajo el control del promotor Actina5C. Modificada de (Evans *et al.* 2009).

### 4.2. Identificación del NB progenitor de las neuronas CCAP/Bur-sicón

Con el fin de que únicamente las neuronas generadas hasta el estadio 10 expresaran el gen reportero *lac-Z* se cruzaron moscas *elav-Gal4 tub-Gal80<sup>ts</sup>* o *ems-Gal4 tub-Gal80<sup>ts</sup>* con moscas *UAS-flp Act>stop>lac-Z*. Se recogieron los embriones resultantes durante 2 horas y se mantuvieron a 29°C durante 4 horas. Durante este periodo, la proteína Gal80<sup>ts</sup> estuvo inactiva y se pudo producir la recombinación. Posteriormente, se pasaron los embriones a 17°C con el fin de que la proteína Gal80<sup>ts</sup> impidiera la activación de la proteína Gal4 y por tanto del sistema Flp/FRT. Se dejaron desarrollarse hasta estadio 17, momento en el cual se trataron según el protocolo de tinciones inmunohistoquímicas explicado más adelante.



## 5. Tinciones con 5-bromo-2'-desoxiuridina

Se recogieron embriones durante 2 horas y se permitió que se desarrollasen a 29°C durante 3 horas. Posteriormente el personal del servicio de transgénesis del CBMSO los decorinó manualmente y los inyectó con una solución de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) (10 mM BrdU; BrdU detection kit, Roche #11 296 736 001). Al alcanzar el estadio 17 se fijaron con formaldehído al 4% en PBT (PBS, "Phosphate buffer solution", solución tampón fosfato, con 0,3% Tween 20) durante 20 minutos. Tras tres lavados de 10 minutos con PBT, se incubaron 2 horas a 37°C con ADNasa (RQ1 Promega #M199A). Se realizaron otros 3 lavados de 10 minutos y una segunda fijación con formaldehído al 4% en PBT. Se continuó con el protocolo de tinciones inmunohistoquímicas explicado más adelante.

## 6. Tinciones inmunohistoquímicas

El SNC de embriones de estadio 17 se diseccionó en PBS con un cable de tungsteno afilado (Wolfram, Madrid, España) fijado en agujas hipodérmicas de 1ml (BD Plastipak, Oxford, UK). Se montaron en portaobjetos previamente polisinados con poly-L-lysine hydrobromide (Sigma # P11524) donde se realizaron los lavados e incubaciones posteriores. Los tejidos se fijaron con una solución de formaldehído (Polysciences #04018) al 4% en PBT durante 20 minutos a temperatura ambiente y en agitación.

Los embriones anteriores al estadio 17 se decorionaron incubándolos en lejía durante 3 minutos. Posteriormente se fijaron con una solución de formaldehído al 4% en PBT y heptano durante 20 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Se eliminó la fase acuosa (fase inferior) y se añadió metanol. Se eliminó la membrana vitelina mediante agitación y se lavó 3 veces con metanol. En este caso los lavados e incubaciones se realizaron en tubos eppendorfs de 1,5 ml.

Los SNCs de larvas de segundo y tercer estadio se diseccionaron en PBT con pinzas afiladas. Tras fijar el tejido con formaldehído al 4% en PBT durante 20 minutos a temperatura ambiente y en agitación, se realizaron 3 lavados con metanol y se guardaron a -20°C durante al menos 12 horas. Al igual que en el caso anterior, los lavados e incubaciones se realizaron en tubos eppendorfs de 1,5 ml.

Una vez realizado el paso de la fijación, en todos los casos se realizaron 4 lavados con BBT-250 (PBT con 0,1% de suero de albumina bovina y 250mM NaCl) de 15 minutos cada uno, a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario en BBT-250 durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente, se lavaron con BBT-250 durante 1 hora (4 lavados de 15 minutos cada uno) y se incubaron con el anticuerpo secundario en BBT-250 durante 1h 30 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad y agitación. Después se realizaron 4 lavados de 15 minutos cada uno con PBT. Por último, los tejidos se montaron en portaobjetos con utilizando como medio de montaje Vectashield (Vector, Burlingame, E.E.U.U.).

# 7. Anticuerpos utilizados

Tabla M.1: Lista de anticuerpos primarios utilizados.

Antígeno	Animal inmunizado	Dilución de uso	Referencia	Fuente
Abd-A	rata	1:500	(Macias et al., 1990)	A. Macías, National Universidad de Córdoba, Córdoba, Argentina.
Abd-B	ratón	1:50	#1A2E9	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB). University of Iowa, Iowa City, E.E.U.U.
$\beta$ -galactosidasa	conejo	1:2000	#55976	ICN-Cappel Research reagents, Aurora, E.E.U.U..
$\beta$ -galactosidasa	ratón	1:2000	#40-1a	DSHB. University of Iowa, Iowa City, E.E.U.U.
Burs	conejo	1:250	(Luan et al., 2006)	B.H. White, National Institute of Mental Health, Bethesda, E.E.U.U.
BrdU	ratón	1:10	#11 296 736 001	Roche, Nutley, E.E.U.U.
Cas	conejo de indias	1:500	(Tsuji et al., 2008)	T.Isshiki, National Institute of Genetics, Mishima, Japón
CCAP	rata	1:100		Generado en este trabajo
Dac	ratón	1:50	#mAbdac2-3	DSHB. University of Iowa, Iowa City, E.E.U.U.
Dpn	conejo	1:500	(Bier et al., 1992)	S.Thor, Linköping University, Linköping, Suecia.
Ems	conejo de indias	1:200	(Walldorf and Gehring, 1992)	U. Walldorf, Saarland University Faculty of Medicine, Saarland, Alemania.
Ems	conejo	1:100	(Dalton et al., 1989)	B.McGinnis, University of California, San Diego, E.E.U.U.
En	ratón	1:50	#4D9	DSHB. University of Iowa, Iowa City, E.E.U.U.
GFP	conejo	1:200	#A-6455	Invitrogen, Carlsbad, E.E.U.U.
GFP	pollo	1:200	#AB16901	Millipore, Temecula, E.E.U.U.
GFP	ratón	1:100	#11814460	Roche, Nutley, E.E.U.U.
Grh	rata	1:100	(Baumgardt et al., 2009)	S.Thor, Linköping University, Linköping, Sweden.
Hb	conejo de indias	1:200	(Tsuji et al., 2008)	T.Isshiki, National Institute of Genetics, Mishima, Japan.

Isl	ratón	1:50	#40.3A4	DSHB. University of Iowa, Iowa City, E.E.U.U.
Kr	c o n e j o de indias	1:400	(Tsuji et al., 2008)	T.Isshiki, National Institute of Genetics, Mishima, Japan.
Lark	conejo	1:100	(McNeil et al., 1998)	R.Jackson, Tufts University, Boston, E.E.U.U.
LK	conejo	1:50	(Nassel, 2002)	D. Nässel, Stockholm University, Stockholm, Sweden.
Noc	c o n e j o de indias	1:100	(Weihe et al., 2004)	S.Cohen, Institute of Molecular and Cell Biology, Singapur
Pdm1	conejo	1:1000	(Terriente Felix et al., 2007)	F.J. Díaz-Benjumea, CBM, Madrid, España.
Tsh	conejo	1:50	(Ng et al., 1996)	S. Cohen, Institute of Molecular and Cell Biology, Singapur.
Ubx	ratón	1:20	#FP3.38	DSHB. University of Iowa, Iowa City, E.E.U.U.

Tabla M.2: Otros reactivos utilizados

Nombre	Dilución	Referencia	Fuente
Faloidina - TRITC	1:100	#1951	Sigma, St. Louis, E.E.U.U.

Table M.3 : Lista de anticuerpos secundarios fluorescentes utilizados

Nombre	Animal inmunizado	Dilución de uso	Referencia	Fuente
Alexa 488	conejo	1:500	#A-21026	Invitrogen, Carlsbad, E.E.U.U..
Alexa 488	pollo	1:500	#A-11039	Invitrogen, Carlsbad, E.E.U.U..
Alexa 488	rata	1:500	#A-21208	Invitrogen, Carlsbad, E.E.U.U..
Alexa 488	ratón	1:500	#A-21202	Invitrogen, Carlsbad, E.E.U.U..
Alexa 555	conejo	1:500	#A-31572	Invitrogen, Carlsbad, E.E.U.U..
Alexa 555	c o n e j o de indias	1:500	#A-21435	Invitrogen, Carlsbad, E.E.U.U..
Alexa 555	rata	1:500	#A-21434	Invitrogen, Carlsbad, E.E.U.U..
Alexa 555	ratón	1:500	#A-31570	Invitrogen, Carlsbad, E.E.U.U..
Alexa 594	conejo	1:500	#A-21207	Invitrogen, Carlsbad, E.E.U.U..
Alexa 594	rata	1:500	#A-21209	Invitrogen, Carlsbad, E.E.U.U..
Alexa 594	ratón	1:500	#A-21203	Invitrogen, Carlsbad, E.E.U.U..
Alexa 647	conejo	1:200	#A-31573	Invitrogen, Carlsbad, E.E.U.U..
Alexa 647	rata	1:200	#A-21247	Invitrogen, Carlsbad, E.E.U.U..



Alexa 647	ratón	1:200	#A-31571	Invitrogen, Carlsbad, E.E.U.U..
-----------	-------	-------	----------	---------------------------------

## 8. Generación de anticuerpo $\alpha$ -CCAP

Se encargó la síntesis del péptido con la secuencia KRPFCAFTGCGRK al servicio de proteómica del CBMSO. Se acopló el péptido a hemocianina de lapa (keyhole limpet hemocyanin, KLH), siguiendo el protocolo descrito por Lateef *et al.* (Lateef et al., 2007). Posteriormente, se añadió NaCl hasta alcanzar una concentración de 0,75 mg de péptido por mL. En el animalario del CBMSO se realizó una primera inyección subcutánea de 200  $\mu$ l de la solución anterior junto a 200  $\mu$ l de adyuvante completo (Sigma #F5881) en ratas. Se realizaron 4 inyecciones más, esta vez con adyuvante incompleto (Sigma #F5506) y con un espacio de 20 días entre ellas. 20 días después de la última inyección se sacrificaron las ratas y se les extrajo la sangre. Tras dejar que esta se coagulara se recogió el sobrenadante con el que se realizaron las posteriores tinciones inmunohistoquímicas.

## 9. Obtención de imágenes por microscopía confocal

Para tomar las imágenes de microscopía confocal se utilizaron los microscopios Zeiss LSM 510 y Zeiss LSM 710 del servicio de microscopía óptica y confocal del CBMSO. Para el tratamiento de imágenes se utilizaron los programas ImageJ y Adobe Photoshop. Salvo que se indique lo contrario, todas las imágenes están orientadas con anterior hacia arriba.

## 10. Medición de los niveles de expresión de Hb

Para medir los niveles de expresión Hb en el NB3-5 se tiñeron embriones de estadio 8 a 11 con el anticuerpo primario  $\alpha$ -Hb y el anticuerpo secundario de conejo de indias Alexa Fluor 555. Se tomaron 6 imágenes del NB3-5 en embriones de estadios 8, 9, 10 y 11. Con el programa ImageJ se seleccionó el área correspondiente al NB3-5 y se calculó la media de los valores de grises. Se multiplicó este valor por el tamaño del área para comparar las intensidades de fluorescencia.

## 11. Estudio estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Microsoft Excel 2007. Las cuantificaciones de los fenotipos observados se compararon con la de los individuos silvestres mediante la prueba t de Student para dos muestras con varianzas desiguales.



# Resultados

---



# 1. Patrón de expresión de los péptidos CCAP y Bursicón

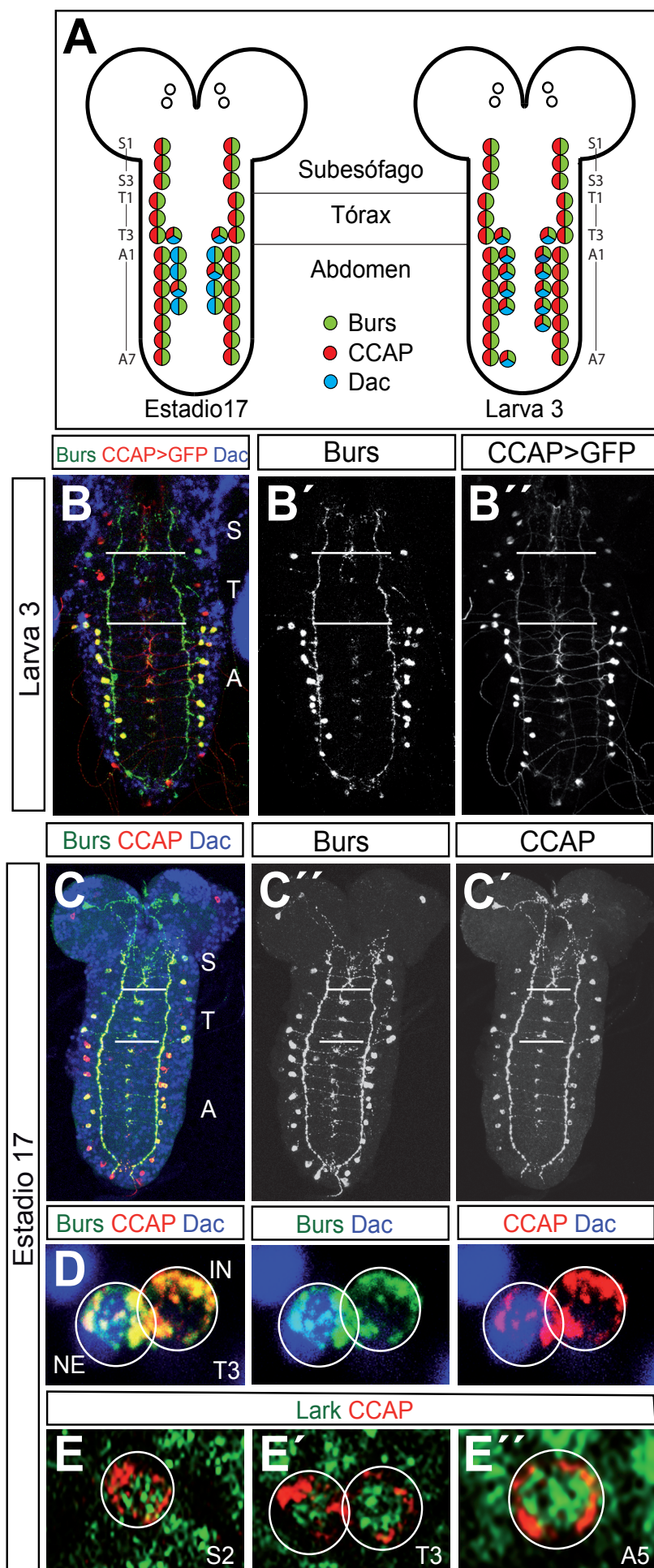
## 1.1 Patrón de expresión de CCAP y Bursicón en larva de tercer estadio

Con el fin de confirmar el patrón de expresión previamente descrito, teñimos larvas de tercer estadio *CCAP-Gal4 UAS-GFP* con anticuerpos que reconocen las proteínas Bursicón, Dac y GFP. Monitorizamos la expresión de CCAP mediante el gen reportero que codifica la proteína GFP y observamos: 4 CCAP-INs en el subesófago, una CCAP-IN en los hemisegmentos T1-A7 y una CCAP-NEs en los hemisegmentos T3-A4. Identificamos las CCAP-NEs presentaron gracias a la expresión del marcador Dac (Veverytsa y Allan, 2011). A pesar de que el anticuerpo  $\alpha$ -Bursicón presenta una señal más tenue en los segmentos anteriores, todas las neuronas CCAP/Bursicón mostraron expresión de GFP y Bursicón (Fig.R.1A, B-B"). Además de estas 38 neuronas que conforman el patrón descrito en la literatura, en la parte final de la CNV, formada por los segmentos A8-A10, observamos dos tipos celulares adicionales. Encontramos de 2 a 4 células marcadas únicamente con  $\alpha$ -GFP y de 2 a 4 células marcadas con  $\alpha$ -Bursicón  $\alpha$ -Dac. Es posible que estas células sean las CCAP-PLs descritas por Veverytsa y Allan (Veverytsa y Allan, 2012). Sin embargo, estos autores identifican las CCAP-PLs en estadio de pupa, momento en el cual observan 6 células CCAP-PLs por CNV marcadas exclusivamente CCAP. Dado que estas células no son objeto de este estudio no las hemos incluido en el esquema que recoge el patrón de expresión de las neuronas CCAP/Bursicón (Fig.R.1A). Por último, en ciertas ocasiones observamos una CCAP-NEs en los hemisegmentos A5-7.

## 1.2. Patrón de expresión de CCAP y Bursicón en embriones de estadio 17

Con el fin de dilucidar los mecanismos necesarios para la especificación de las neuronas CCAP/Bursicón nos propusimos visualizar estas neuronas lo más tempranamente posible. Las neuronas CCAP/Bursicón se identifican por primera vez al final del desarrollo embrionario, en el estadio 17 tardío (Campos-Ortega y Hartenstein, 1985), mediante una tinción inmunohistoquímica con anticuerpos que reconocen ambos neuropéptidos. Los embriones de este estadio se caracterizan por haberse desarrollado durante 18 horas tras la puesta del huevo así como por permanecer dentro de la membrana vitelina y retener aire en sus tráqueas.

Tras teñir embriones silvestres de estadio 17 con los anticuerpos  $\alpha$ -CCAP,  $\alpha$ -Bursicón y  $\alpha$ -Dac identificamos dos de los cuatro tipos neuronales descritos por Veverytsa y Allan (Veverytsa y Allan, 2012), las CCAP-INs y las CCAP-NEs tempranas. Observamos una CCAP-IN en cada hemisegmento de la CNV, desde el hemisegmento S1 hasta el hemisegmento A7, y una CCAP-NE temprana en los hemisegmentos T3-A4 (Fig.R.1A, C-C"). Al igual que en la larva de tercer estadio, diferenciamos las CCAP-NEs del resto de neuronas CCAP/Bursicón gracias a la presencia del marcador Dac (Veverytsa y Allan, 2011) (Fig.R.1D-D"). Es importante señalar que en tinciones con el



anticuerpo  $\alpha$ -CCAP, las CCAP-NEs de los segmentos A1-A4 se marcan de forma estocástica, mientras que estas células siempre aparecen marcadas en tinciones con el anticuerpo  $\alpha$ -Bursicón. Cabe igualmente notar que el anticuerpo  $\alpha$ -Bursicón muestra una mayor señal en los segmentos posteriores mientras que el anticuerpo  $\alpha$ -CCAP lo hace en los segmentos anteriores.

Dado que las CCAP-INs y CCAP-NEs tempranas son las únicas neuronas CCAP/Bursicón identificables en embriones de estadio 17, centramos nuestro trabajo en entender cómo se especifican estos dos tipos celulares. En embriones de estadio 17 solo visualizamos un tipo de neuronas CCAP eferentes, las CCAP-NE tempranas, por lo que nos referiremos a ellas como CCAP-NEs. Al iniciar el proyecto generamos un anticuerpo que reconoce el neuropéptido CCAP (ver material y métodos), razón por la cual usamos preferentemente este anticuerpo para identificar las neuronas CCAP/Bursicón mientras que utilizamos el anticuerpo  $\alpha$ -Bursicón únicamente en los casos que lo requieran.

Con el fin de caracterizar con mayor detalle las neuronas CCAP/Bursicón buscamos genes que pudieran estar expresándose en los dos tipos neuronales presentes en estadio 17. En tinciones con anticuerpos que reconocen las proteínas CCAP y Lark, observamos que el gen *lark* se expresa en el núcleo de todas las neuronas CCAP/Bursicón (Fig. R.E-E'). *lark* desempeña un papel regulador en el reloj circadiano que controla la eclosión de la mosca adulta. Se ha descrito que en pupa, Lark se localiza en el citoplasma de las neuronas CCAP positivas mientras que en resto de neuronas se encuentra en el núcleo (Zhang et al., 2000). No observamos tal diferencia en embriones de estadio 17.

## 2. Identificación del NB progenitor de las células CCAP/Bursicón

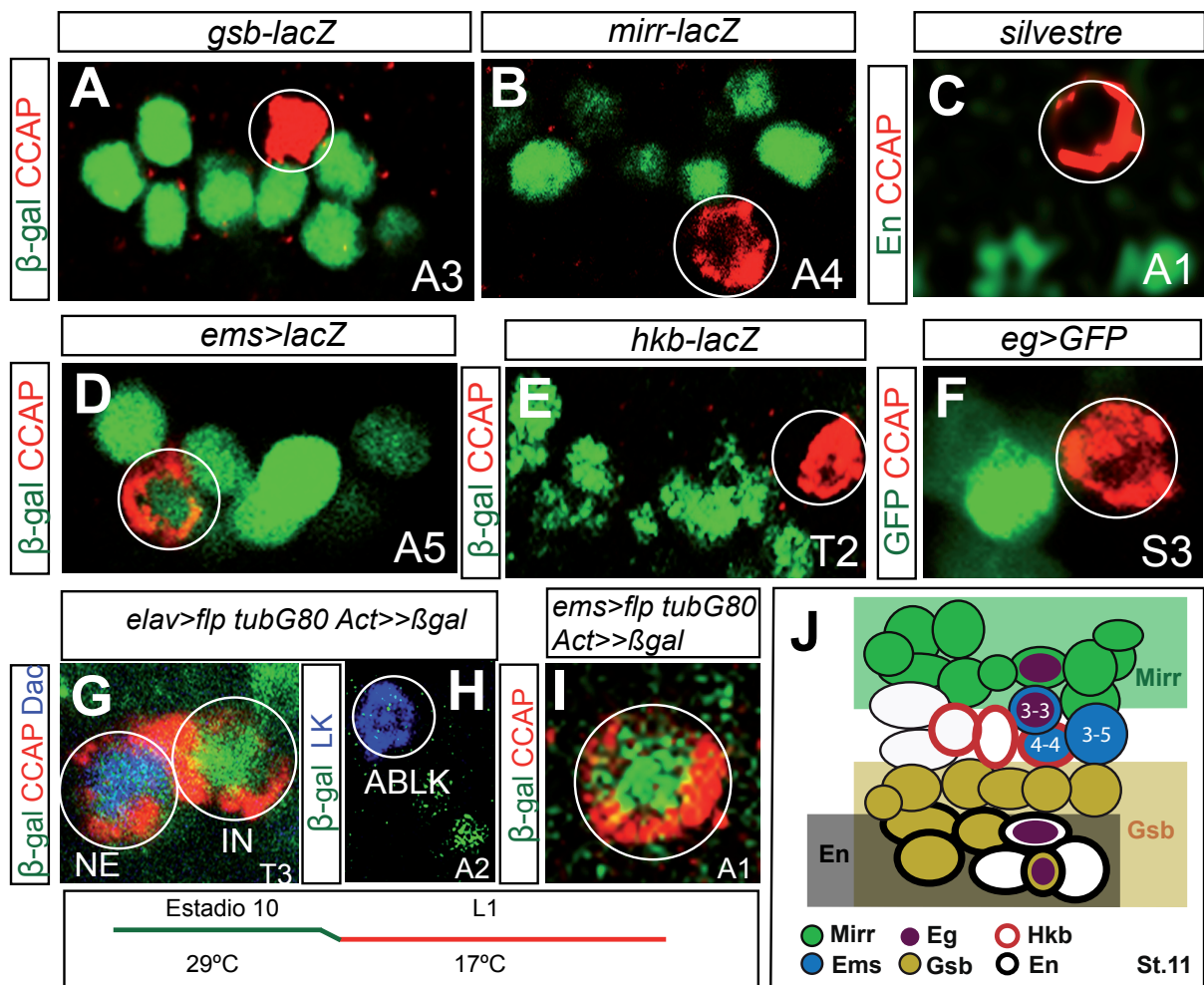
Una aproximación para tratar de esclarecer las regulaciones génicas implicadas en la especificación de un tipo neuronal consiste en unir el destino final, la neurona diferenciada, con su célula progenitora, el NB. Trabajos de laboratorios independientes han permitido identificar de forma inequívoca los 30 NBs que delaminan en cada hemisegmento en función de su posición, su momento de delaminación, la progenie que generan y la combinatoria única de marcadores moleculares que expresan (Bossing et al., 1996; Doe, 1992; Schmidt et al., 1997). Conocer el NB progenitor nos dará por tanto información sobre genes potencialmente implicados en la especificación de las neuronas CCAP/Bursicón. En suma, identificar el NB de origen de una neurona es un elemento clave a la hora de comprender cómo esta se ha especificado.

### 2.1. Coexpresión de las neuronas CCAP/Bursicón con distintos marcadores

La primera estrategia que seguimos para hallar el NB progenitor de las neuronas CCAP/Bursicón fue utilizar los marcadores moleculares descritos por el grupo de C.Q.Doe (<http://www.neuro.uoregon>).



edu/doelab/NBmap.html). Estos marcadores permiten identificar en embriones de estadio 11, los 30 NBs presentes por hemisegmento. Teñimos embriones de estadio 17 de diferentes líneas transgénicas *lacZ* que reproducen la expresión silvestre de un gen marcador, con los anticuerpos  $\alpha$ -CCAP y  $\alpha$ - $\beta$ -galactosidasa. Es importante señalar que existe un desfase entre el momento en el que los marcadores han sido descritos (estadio 11) y el momento en el que nosotros los visualizamos (estadio 17). Es posible que durante este tiempo algunas células ganen o pierdan la expresión de los genes marcadores. Por otra parte, salvo en los casos de *gooseberry* (*gsb*) (Buenzow y Holmgren, 1995) y *eagle* (*eg*) (Higashijima et al., 1996), la expresión de los distintos marcadores ha sido descrita en los NBs, no en su progenie, por lo que los resultados que obtengamos deben ser interpretados con precaución.



**Fig.R.2. Identificación del NB progenitor de las neuronas CCAP/Bursicón**

(A ,B, D, E) Expresión de CCAP (rojo) y  $\beta$ -galactosidasa (verde) en un hemineurómero de embriones, *gsb-lacZ* (A), *mirr-lacZ* (B), *ems-Gal4 UAS-lacZ* (D) y *hkb-lacZ* (E). (C) Expresión de CCAP (rojo) y En (verde) en un hemineurómero de un embriones silvestre. (F) Expresión de CCAP (rojo) y GFP (verde) en un hemineurómero de un embrión *eg-Gal4 UAS-GFP*. (G-H) Ampliación de un hemineurómero de un embrión *elav-Gal4 UAS-flp tub-G80ts Act5C>stop>lacZ* crecido a 29°C hasta estadio 9 y a 17°C hasta estadio 17 en los que se muestra la expresión de CCAP (rojo) y  $\beta$ -galactosidasa (verde) y Dac (azul) (G) y  $\beta$ -galactosidasa (verde) y Lk (azul) (H). (I) Ampliación de un hemineurómero de un embrión *ems-Gal4 UAS-flp tub-Gal80ts Act5C>stop>lacZ* crecido a 29°C hasta estadio 9 y a 17°C hasta estadio 17, en el que se muestra la expresión de CCAP (rojo) y  $\beta$ -Galactosidasa (verde). Se adjunta un esquema que resume las condiciones experimentales (J) Esquema del patrón de NBs de un hemisegmento derecho de un embrión de estadio 11. Se muestra la expresión de distintos marcadores. El NB3-5 es el único NB que expresa *ems* pero no *mirr*, *eg*, *hkb*, *gsb* o *en*. En la parte baja de cada imagen se señala número del segmento que se muestra ampliado En todos los casos las tinciones inmunohistoquímicas se realizaron en embriones de estadio 17.



Comenzamos el estudio con el gen *gsb*, el cual se expresa en los NBs de la fila 5 y 6 así como en los NBs 7-1 y 7-3. *gsb* se expresa además en la progenie de todos ellos (Buenzow y Holmgren, 1995). Las neuronas CCAP/Bursicón no presentan expresión de *gsb<sup>01155</sup>-lacZ* sino que se localizan en una posición anterior y lateral con respecto a las células *gsb<sup>01155</sup>-lacZ* positivas (Fig.R.2A). Por otra parte, miramos la expresión de *mirror-lacZ* (*mirr-lacZ*) en las neuronas CCAP/Bursicón sabiendo que *mirr-lacZ* es un marcador de los NBs más anteriores. Observamos que las neuronas CCAP/Bursicón ocupan una posición posterior y lateral con respecto a las células generadas por NBs de las filas 1, 2 y 3 y marcadas con *mirr-lacZ*, si bien ellas mismas no expresaban este marcador (Fig.R.2B). Asimismo, teñimos embriones silvestres con los anticuerpos  $\alpha$ -CCAP y  $\alpha$ -En y comprobamos que las neuronas CCAP/Bursicón se localizaban anteriormente a las células de las filas 6 y 7 caracterizadas por la expresión de En (Fig.R.2C).

La posición de las neuronas CCAP/Bursicón con respecto a estos marcadores topográficos indica que su NB progenitor pertenece a la fila 4 y ocupa una posición lateral. Teniendo en cuenta estos criterios, el número de NBs candidatos se reduce a tres, el NB 3-3, el NB 3-5 y el NB 4-4. Estos tres NBs son además los tres únicos NBs que expresan *empty spiracles* (*ems*) (Birkholz et al., 2013; Hartmann et al., 2000). Estos autores sugieren que la expresión de *ems* se mantiene en la progenie de los NBs 3-5 y 4-4 pero no en la del 3-3. En una tinción de embriones de estadio 17 *ems-Gal4 UAS-lacZ* con anticuerpos  $\alpha$ -Bursicón,  $\alpha$ - $\beta$ -galactosidasa y  $\alpha$ -Dac observamos que tanto las CCAP-INs como las CCAP-NEs expresan *lacZ*, lo que sugiere que el NB progenitor de estas células es uno de los tres NBs Ems positivos (Fig.R.2D).

Con el fin de discriminar entre estos tres NBs, estudiamos la expresión de *huckebein* (*hkb<sup>5953</sup>-lacZ*). Se ha descrito que *hkb* se expresa en el NB 4-4 y no en el NB 3-5 ni en el NB 3-3. Las neuronas CCAP/Bursicón no mostraron expresión de este marcador (Fig.R.2E), por lo que descartamos el NB 4-4. Además, mediante una tinción de embriones *eg-Gal4 UAS-GFP* con los anticuerpos  $\alpha$ -GFP y  $\alpha$ -CCAP comprobamos que las neuronas CCAP/Bursicón no expresan *eg* (Fig.R.2F), un marcador de los NBs 2-4, 3-3, 6-4 y 7-3 y de sus linajes (Higashijima et al., 1996).

Del estudio de la coexpresión del CCAP con distintos marcadores inferimos que el NB progenitor de las neuronas CCAP/Bursicón es probablemente el NB 3-5 (Fig.R.2J).

## 2.2. Identificación del momento de delaminación del NB progenitor de las neuronas CCAP/Bursicón

Los tres NBs Ems positivos se distinguen entre sí por su momento de delaminación. El NB 3-5 delamina en el estadio 8, mientras que los NBs 4-4 y 3-3 lo hacen en el estadio 11. Para reforzar los resultados anteriores quisimos determinar si las neuronas CCAP/Bursicón proceden de un NB de delaminación temprana o tardía. Con este fin marcamos con  $\beta$ -galactosidasa únicamente las neuronas que se generaron hasta el estadio 10 mediante la construcción *elav-Gal4 UAS-flp tub-*

*Gal80<sup>s</sup> Act5C>stop>lacZ*(ver material y métodos). Realizamos una triple tinción con los anticuerpos  $\alpha$ - $\beta$ -galactosidasa,  $\alpha$ -CCAP y  $\alpha$ -Dac en embriones de estadio 17 y observamos expresión de  $\beta$ -galactosidasa tanto en CCAP-INs como en CCAP-NEs (Fig.R.2G). Como control comprobamos que las neuronas ABLKs no estaban marcadas (Fig.R.2H). Estas neuronas pertenecen al linaje del NB 5-5, un NB que al igual que el NB 4-4 y el NB 3-3 delamina en estadio 11 y pueden identificarse con una tinción con el anticuerpo  $\alpha$ -Leucoquinina (Benito-Sipos et al., 2010). Realizamos el mismo experimento pero dirigiendo esta vez la expresión de  $\beta$ -galactosidasa con *ems-Gal4*. Al igual que en el caso anterior encontramos neuronas CCAP/Bursicón con expresión de  $\beta$ -galactosidasa (Fig.R.2I).

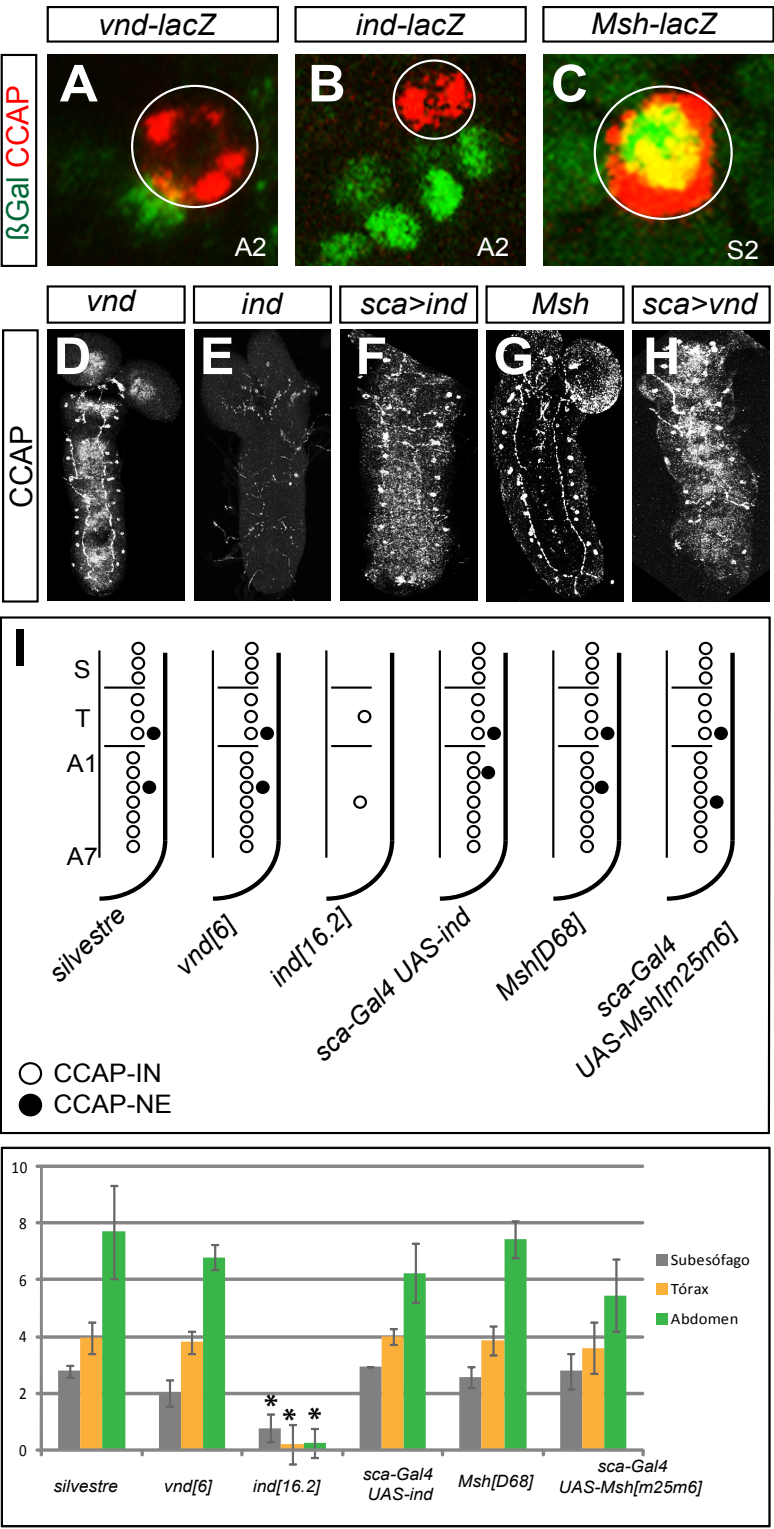
Estos resultados nos indican que el NB progenitor de las neuronas CCAP/Bursicón expresa Ems y delamina antes del estadio 10. Así, concluimos que el NB 3-5 es el progenitor de las neuronas CCAP/Bursicón ya que es el único NB que cumple estas condiciones (Fig.R.2J). No encontramos diferencias en el comportamiento de estas neuronas en los diferentes segmentos por lo que concluimos que todas tienen el mismo NB progenitor.

### 2.3. Estudio de la función de los genes columnares en la especificación de las neuronas CCAP/Bursicón

Los genes columnares *vnd*, *ind* y *Msh* se expresan en el neuroectodermo definiendo tres columnas paralelas a la línea media (Chen et al.; Isshiki et al., 1997; McDonald et al., 1998), lo que les convierte en marcadores topográficos en el eje dorso-ventral. Estudiamos la expresión de estos tres genes tiñiendo embriones de estadio 17 *vnd-lacZ*, *ind-lacZ* y *Msh<sup>Δ96</sup>-lacZ* con anticuerpos  $\alpha$ -CCAP y  $\alpha$ - $\beta$ -galactosidasa. Solo en el caso de la línea *Msh-lacZ* observamos expresión de  $\beta$ -galactosidasa en las neuronas CCAP/Bursicón (Fig.R.3A, B, C). Dado que los NBs 3-3, 3-5 y 4-4, a pesar de no expresar ellos mismos *Msh*, delaminan de una región neuroectodérmica *Msh* positiva (Isshiki et al., 1997), es posible que la expresión de  $\beta$ -galactosidasa en las neuronas CCAP/Bursicón de cuenta de la expresión de *Msh* en el NE de origen de estos NBs.

Mediante tinciones con el anticuerpo  $\alpha$ -CCAP en embriones de estadio 17, analizamos el efecto de la falta de función y de la expresión ectópica de los genes columnares en la especificación de las neuronas CCAP/Bursicón. Los mutantes *ind* (*ind<sup>l6.2</sup>*) mostraron una disminución significativa en el número de neuronas CCAP/Bursicón (Fig.R.3E, I, J y tabla 1), mientras que en mutantes *vnd* (*vnd<sup>6</sup>*) y *Msh* (*Msh<sup>D68</sup>*) el número de neuronas CCAP/Bursicón no se vio afectado (Fig.R.3D, E, G, I, J y tabla 1). Al expresar ectópicamente *ind* y *Msh* en el NE con *scabrous-Gal4* (*sca-Gal4 UAS-ind* y *sca-Gal4 UAS-Msh<sup>m25m6</sup>*) no observamos ningún fenotipo (Fig.R.3F, H, I, J y tabla 1). No pudimos analizar el efecto de la expresión ectópica de *vnd* ya que esta produjo la muerte temprana de los embriones. Estos resultados no apoyan la hipótesis según la cual el NB 3-5 es el progenitor de las neuronas CCAP/Bursicón. Sin embargo, no se ha establecido con claridad el papel de los genes columnares en el control de la identidad de los NBs. En el caso la falta de función de *Msh*, tan solo se ha descrito la transformación de un NB de la columna más dorsal, el NB4-3, en uno perteneciente

a la columna intermedia, el NB 4-2 (Isshiki et al., 1997). Por otra parte, se ha observado que la falta de función de *ind* elimina los NBs de la columna intermedia, pero su posible efecto sobre los NBs más dorsales no ha sido examinado (Weiss et al., 1998). Con lo que estos resultados, sin confirmar nuestras conclusiones, no las invalidan.



### 3. Análisis del linaje temprano del NB 3-5

Para integrar los resultados obtenidos y tratar de entender así las regulaciones génicas que dan lugar a las neuronas CCAP/Bursicón es de gran utilidad conocer cuántas neuronas genera el NB 3-5, por qué ventanas temporales pasa y cuál es la duración de cada una de ellas.

Se ha descrito que el NB 3-5 se genera durante la primera ola de delaminación, en estadio 8 (Doe, 1992). Según los datos de Schmidt *et al.* (Schmidt *et al.*, 1997), en embriones de estadio 14 el NB 3-5 ha generado de 19 a 24 interneuronas con proyecciones tanto ipsilaterales como contralaterales. Schmid *et al.* (Schmid *et al.*, 1999) señalan que en embriones de estadio 17, el linaje del NB 3-5 se compone de 12 a 15 interneuronas, además de una motoneurona en el hemisegmento T1 y una célula glial en los hemisegmentos abdominales. Ambos estudios se realizaron en embrión momento en el cuál las proyecciones axonales de las CCAP-NEs son difícilmente apreciables, lo que explica que ninguno de los autores identifique neuronas eferentes en los segmentos T3-A4.

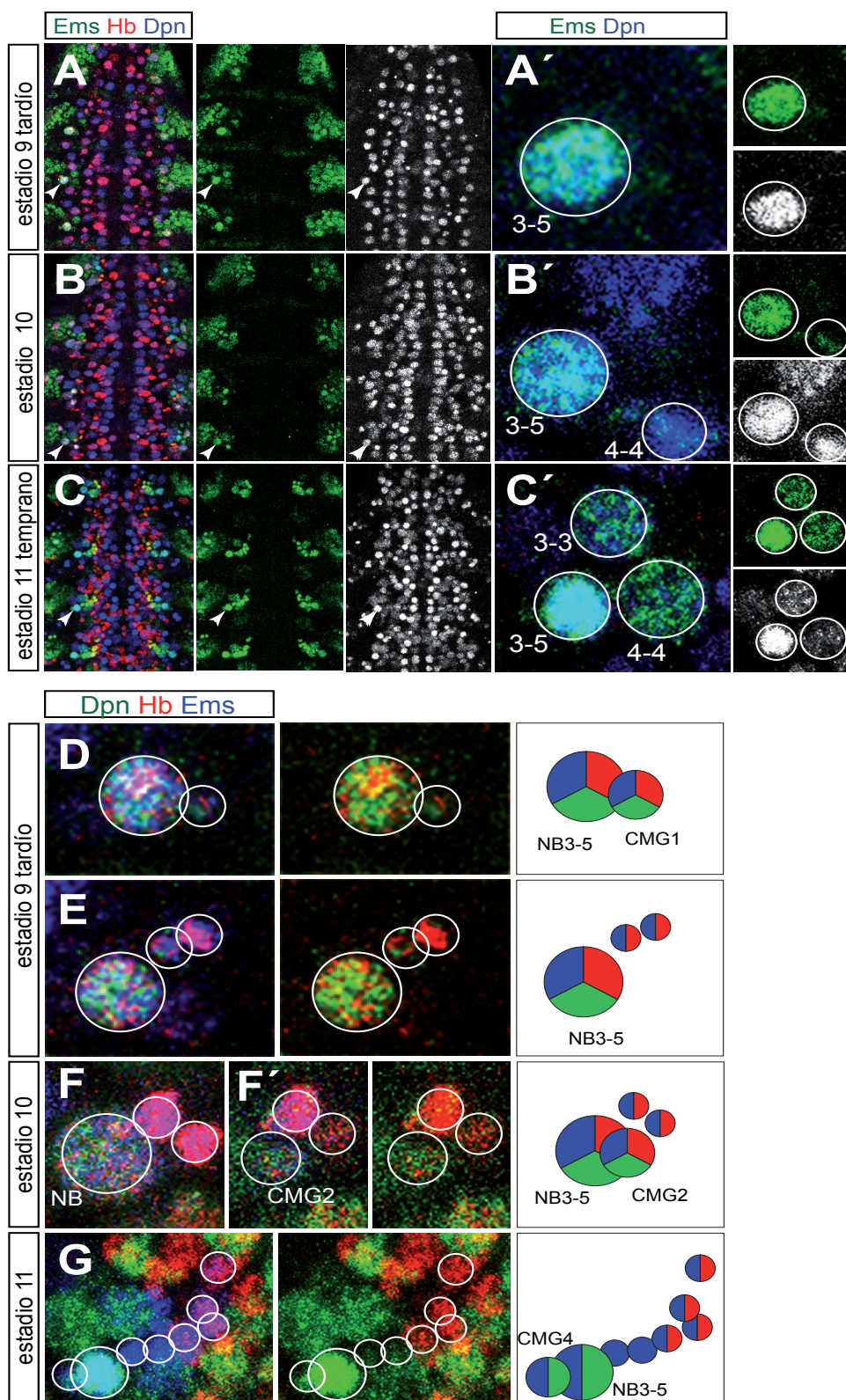
En nuestro trabajo estudiamos el linaje del NB 3-5 desde el momento de su delaminación, en el estadio 8, hasta el estadio 11. Durante este período de tiempo el NB 3-5 y su progenie son las únicas células de la CNV que expresan *ems*. A partir del estadio 11, al delaminar los otros dos NBs Ems positivos, los NBs 3-3 y 4-4, el linaje del NB 3-5 no puede identificarse de forma inequívoca (Fig.R.4A-C'). Para llevar a cabo la descripción del linaje del NB 3-5 teñimos embriones de estadio 8 a 11 con los siguientes anticuerpos:  $\alpha$ -Ems para localizar el NB 3-5 y su progenie,  $\alpha$ -Deadpan (Dpn) para diferenciar los NBs y CMGs del resto de tipos celulares (Bier *et al.*, 1992), y  $\alpha$ -Hb,  $\alpha$ -Kr y  $\alpha$ -Pdm para identificar las células pertenecientes a las diferentes ventanas temporales.

Tras delaminar, en el estadio 8, el NB 3-5 expresa Ems, Hb, Kr y Pdm. Posteriormente, se divide originando la primera CMG, la cual da lugar a dos células que expresan los mismos marcadores. En el estadio 10, el NB deja de expresar Pdm pero mantiene la expresión de Hb y Kr mientras genera la segunda CMG. Esta se divide dando lugar a su vez dos células. Finalmente, en el estadio 11 temprano, el NB 3-5 expresa únicamente Kr y produce una tercera CMG que genera dos células más. De este apartado concluimos que durante la ventana Hb, el NB 3-5 se divide dos veces generando cuatro células (Fig.R.4D-G y Fig.R.5A-E).

### 4. Estudio del papel de los genes homeóticos en la adquisición del destino CCAP/Bursicón

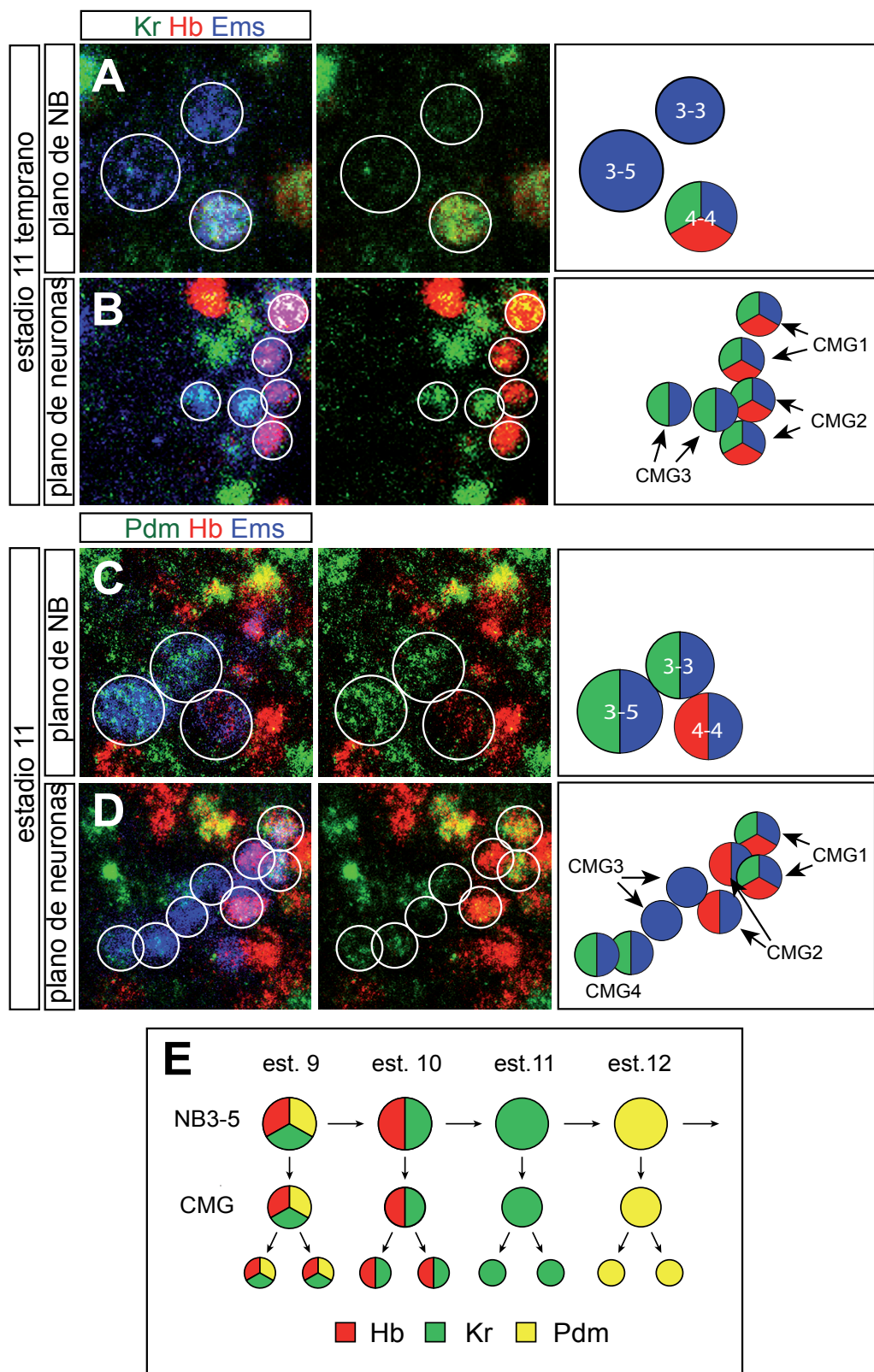
Las neuronas CCAP/Bursicón presentan un patrón heterogéneo a lo largo del eje antero-posterior: en embriones tardíos las CCAP-INs están presentes en todos los segmentos de la CNV, mientras que las CCAP-NEs tempranas aparecen solo del T3 al A4. Los responsables últimos de estas diferencias son los genes homeóticos por lo que analizamos su función en la especificación de las neuronas CCAP/Bursicón.





**Fig.R.4. Análisis del linaje temprano del NB3-5 (I)**

(A, B, C) Expresión de Ems (verde) Hb (rojo) y Dpn (azul) en cuatro segmentos abdominales del SNC de embriones silvestres de estadio 9 tardío (A) estadio 10 (B) y estadio 11 (C). Los canales verde y azul se muestran por separado. (A', B', C') Ampliación del plano focal donde se encuentra el NB3-5 señalado en las imágenes A, B, C por las puntas de flecha. Se muestra la expresión de Ems (verde) y Dpn (azul) así como los dos canales por separado. En estadio 9 tardío se observa únicamente el NB3-5, en estadio 10 se observa también el NB4-4 aunque este se encuentra en un plano focal más externo. Por último, en estadio 11 se observan los tres NB Ems positivos, los NB3-3, 3-5 y 4-4, situados en el mismo plano. (D-G) Expresión de Dpn (verde), Hb (rojo) y Ems (azul) en un hemineurómero izquierdo abdominal de embriones silvestres de estadio 9, 10 y 11. En cada caso se muestra un esquema de los patrones de expresión observados. (F-F') Se muestran dos planos focales para poder observar el NB3-5 y la CMG2.



**Fig.R.5. Análisis del linaje temprano del NB3-5 (II)**

(A-B) Expresión de Kr (verde), Hb (rojo) y Ems (azul) en un hemineurómero izquierdo de embriones de estadio 11 temprano. Se muestra dos planos focales, en el primero se encuentran situados los NBs (A) y en el segundo, más interno, las neuronas (B). Los resultados observados se esquematizan en el dibujo adyacente. (C-D) Expresión de Pdm (verde), Hb (rojo) y Ems (azul) en un hemineurómero izquierdo de embriones de estadio 11 temprano. Se muestran dos planos focales, en el primero se encuentran situados los NBs (C) y en el segundo, más interno, las neuronas (D). Los resultados observados se esquematizan en el dibujo adyacente. (E) Esquema del linaje temprano del NB3-5 en el que se muestran la expresión de Hb, Kr y Pdm.



## 4.1. Análisis de la función de los genes homeóticos en la especificación de las neuronas CCAP/Bursicon

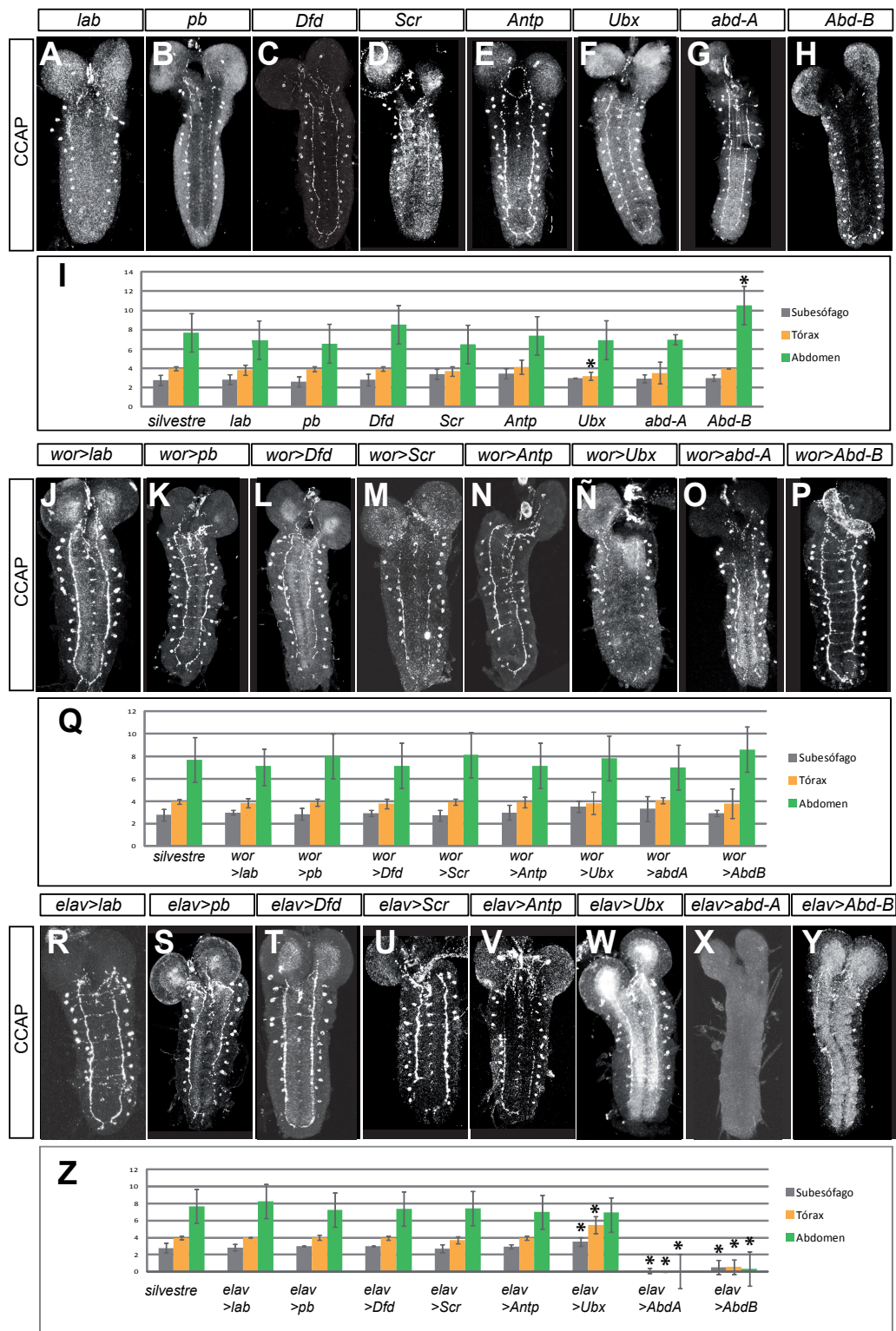
Como primera aproximación estudiamos el efecto de la falta de función y la expresión ectópica de los distintos genes homeóticos sobre el patrón de expresión de las neuronas CCAP/Bursicon. Durante el desarrollo del SNC de *Drosophila melanogaster*, los genes homeóticos actúan a tres niveles: en el neuroectodermo, en los NBs y en su progenie (revisado por Estacio-Gomez y Diaz-Benjumea, 2013; Rogulja-Ortmann y Technau, 2008), por lo que estudiamos la expresión ectópica de todos ellos tanto en NBs (*wor-Gal4*) como en neuronas (*elav-Gal4*). La proteína Elav se expresa exclusivamente en las neuronas, de modo que la construcción *elav-Gal4* ha sido regularmente utilizada para dirigir de manera específica las expresiones ectópicas en este tipo celular. Sin embargo, Berger *et al.* describieron que esta construcción se expresa también en algunos NBs (Berger *et al.*, 2007). Comprobamos que esto no sucedía en el linaje del NB 3-5 tiñendo embriones *elav-Gal4 UAS-GFP* de estadio 11 con los anticuerpos  $\alpha$ -GFP y  $\alpha$ -Ems (Fig.S.1).

La falta de función de *lab* (*lab<sup>d</sup>*), *pb* (*pb<sup>10</sup>*), *Dfd* (*Dfd<sup>l</sup>*), *Scr* (*Scr<sup>d</sup>*) y *Antp* (*Antp<sup>25</sup>*) así como en sus respectivas expresiones ectópicas, tanto con *wor-Gal4* como con *elav-Gal4* dieron lugar a un patrón silvestre de expresión de CCAP (Fig.R.6A-E, I-N, Q-V, Z y tabla 1). Por el contrario, tanto la falta de función, como la expresión ectópica de *Ubx*, *abd-A* y *Abd-B* provocaron distintos fenotipos que detallaremos a continuación.

## 4.2. Estudio de la función de los genes *Ubx* y *abd-A*

4.2.1. *Ubx* y *abd-A* actúan de forma redundante en la especificación de las CCAP-NEs de los segmentos del T3 al A4

Las CCAP-NEs, tanto tempranas como tardías se generan únicamente desde el segmento T3 al segmento A7. Su patrón de expresión coinciden por lo tanto con el de *Ubx*, ya que este se expresa desde el segmento T2 anterior hasta el segmento A7 anterior (Hirth *et al.*, 1998). En primer lugar analizamos la expresión de *Ubx* en las neuronas CCAP/Bursicon. Con este fin teñimos embriones silvestres de estadio 11 con los anticuerpos  $\alpha$ -Ems y  $\alpha$ -Ubx. Observamos que todas las células del linaje temprano del NB 3-5 del segmento T3 al segmento A7, así como el propio NB 3-5, expresaban *Ubx* (Fig.R.7A). Posteriormente, realizamos una tinción con los anticuerpos  $\alpha$ -CCAP y  $\alpha$ -Ubx en embriones silvestres de estadio 17 y observamos que todas las CCAP-NEs tempranas, presentes en los segmentos T3 a A4, expresaban *Ubx*. Las CCAP-INs correspondientes a estos segmentos también presentaban expresión de *Ubx*, sin embargo no observamos expresión de *Ubx* las neuronas CCAP-Bursicon de los demás segmentos (Fig.R.7B). Por último, teñimos larvas de tercer estadio con los anticuerpos  $\alpha$ -CCAP y  $\alpha$ -Ubx. Encontramos expresión de *Ubx* en las mismas neuronas que en el caso anterior exceptuando las neuronas del segmento T3, las cuales, no mostraron señal de *Ubx* en este estadio (Fig.R.7C).



**Fig. R.6. Estudio del papel de los genes *homeóticos***

(A-H) Expresión de CCAP en el SNC de embriones de estadio 17 *lab*<sup>Δ</sup> (A), *pb*<sup>10</sup> (B), *Dfd*<sup>1</sup> (C), *Scr*<sup>Δ</sup> (D), *Antp*<sup>14</sup> (E), *Ubx*<sup>6.28</sup> (F), *abd-A*<sup>M1</sup> (G), *Abd-B*<sup>M1</sup> (H). (I) Histograma en el que se indica el número medio de neuronas CCAP/Bursicón en el subesófago, tórax y abdomen en los fenotipos anteriores.

(J-P) Expresión de CCAP en el SNC de embriones de estadio 17 en los que se expresó ectópicamente con *wor-Gal4 UAS-lab* (J), *UAS-pb* (K), *UAS-Dfd<sup>Δ</sup>* (L), *UAS-Scr* (M), *UAS-Antp* (N), *UAS-Ubx<sup>Δ</sup>* (Ñ), *UAS-abd-A<sup>20-10-1</sup>* (O), *UAS-Abd-B<sup>m25G19</sup>* (P). (Q) Histograma en el que se indica el número medio de neuronas CCAP/Bursicón en el subesófago, tórax y abdomen en los fenotipos anteriores.

(R-Y) Expresión de CCAP en el SNC de embriones de estadio 17 en los que se expresó ectópicamente con *elav-Gal4 UAS-lab* (R), *UAS-pb* (S), *UAS-Dfd<sup>Δ</sup>* (T), *UAS-Scr* (U), *UAS-Antp* (V), *UAS-Ubx<sup>Δ</sup>* (W), *UAS-abd-A<sup>20-10-1</sup>* (X), *UAS-Abd-B<sup>m25G19</sup>* (Y). (Z) Histograma en el que se indica el número medio de neuronas CCAP/Bursicón en el subesófago, tórax y abdomen en los fenotipos anteriores. Las barras de error representan las desviaciones típicas de la media. El asterisco señala los casos en los que las diferencias con respecto a los individuos silvestres son significativas (p-valor < 0.001).

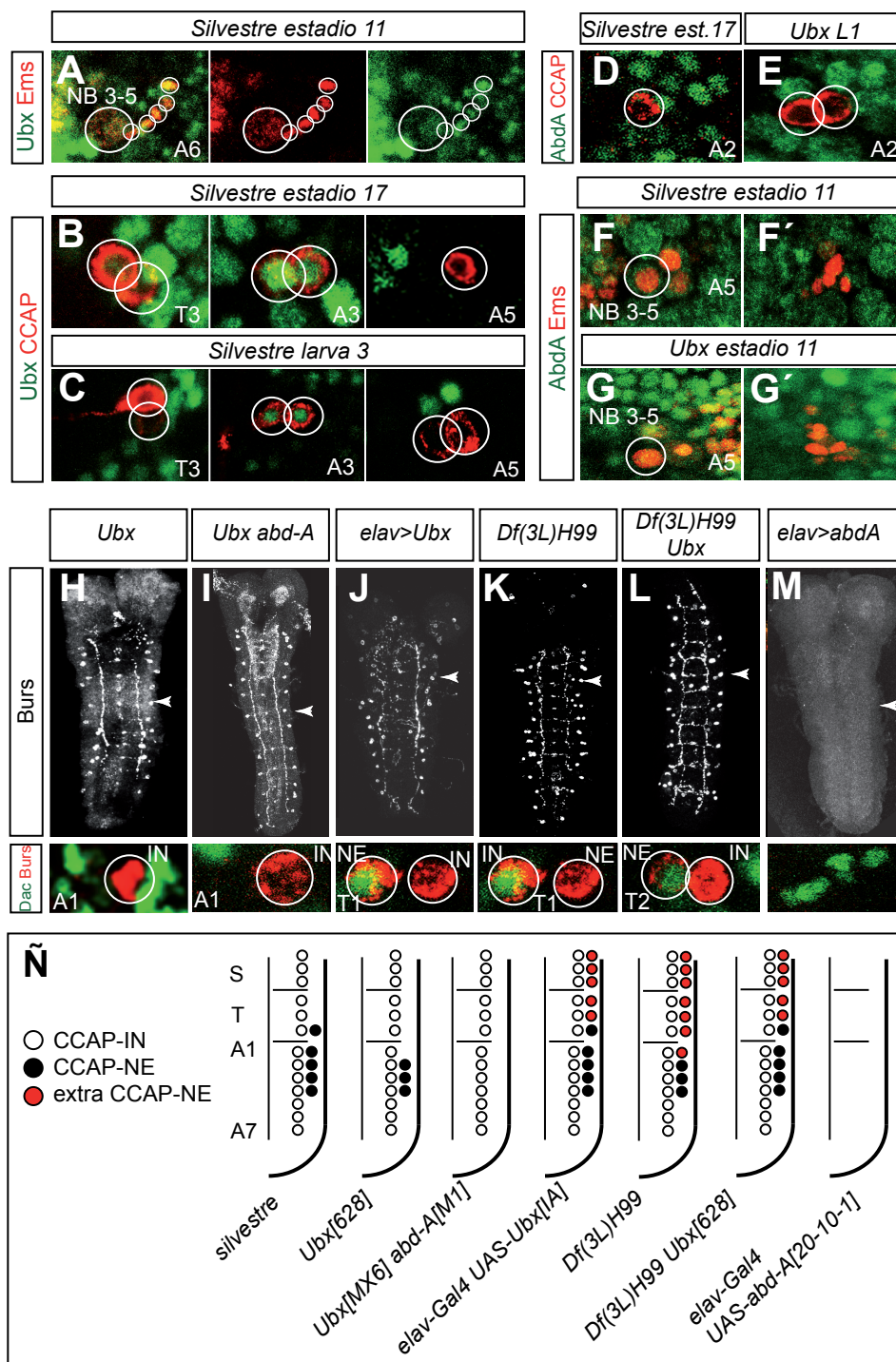


Por otra parte, estudiamos la falta de función de *Ubx* tiñendo embriones mutantes para *Ubx* (*Ubx<sup>6.28</sup>*) de estadio 17 con los anticuerpos  $\alpha$ -Bursicón y  $\alpha$ -Dac. Estos embriones no presentaron ninguna CCAP-NEs en los segmentos T3 y A1. Las CCAP-INs así como las CCAP-NEs de los segmentos A2, 3 y 4 no se vieron afectadas (Fig.R.7H,Ñ y tabla 1). Desde el segmento A1 posterior hasta el A7 posterior se expresa, junto a *Ubx*, el gen *abd-A*. Es posible que ambos genes jueguen un papel redundante en la especificación de las CCAP-NEs en aquellos segmentos en los que se coexpresan (del segmento A1 posterior al segmento A7). Embriones mutantes para *abd-A* (*abd-A<sup>M1</sup>*) teñidos con el anticuerpo  $\alpha$ -CCAP dieron lugar a un fenotipo silvestre (Fig.R.6G-I y tabla 1). Sin embargo, embriones de estadio 17 dobles mutantes para *Ubx* y *abd-A* (*Ubx<sup>MX6</sup> abd-A<sup>M1</sup>*) teñidos con los anticuerpos  $\alpha$ -Bursicón y  $\alpha$ -Dac no presentaron ninguna CCAP-NEs mientras que el número de CCAP-INs no se vió afectado (Fig.R.7I,Ñ y tabla 1). Por lo tanto, concluimos que *Ubx* se requiere en los segmentos T3-A1 para la correcta especificación de las CCAP-NEs y que en los segmentos A2-4, *Ubx* y *abd-A* tienen una función redundante en la especificación de las neuronas CCAP/Bursicon.

*Ubx* y *abd-A* se expresan en los segmentos A1-A7 en patrones complementarios: *Ubx* se expresa preferentemente en la parte anterior de los segmentos (Carroll et al., 1988) y *abd-A* lo hace en la parte posterior (Macias et al., 1990). Esta observación sugiere que *Ubx* y *abd-A* están regulándose negativamente el uno al otro. En el SNC, se ha observado que la falta de función de *abd-A* desreprime la expresión de *Ubx* (Bender, 2008), mientras que la falta de función de *Ubx* no afecta a la expresión de *abd-A* (Karch et al., 1990). Por otra parte, se han identificado neuronas que expresan ambos genes (Estacio-Gomez, 2013). Dado que es posible que la relaciones reguladoras entre sean específicas de cada tipo celular estudiamos la expresión de *Abd-A* en individuos silvestres y mutantes para *Ubx* (*Ubx<sup>6.28</sup>*). Embriones de estadio 17 tanto de ambos genotipos teñidos con los anticuerpos  $\alpha$ -Abd-A y  $\alpha$ -CCAP no presentaron ninguna neurona CCAP/Bursicón con expresión de *Abd-A* (Fig.R.7D,E). Tratamos de visualizar la expresión de este *Abd-A* en el linaje del NB3-5 en embriones de estadio 11 silvestres y mutantes para *Ubx* (*Ubx<sup>6.28</sup>*) tiñéndolos con los anticuerpos  $\alpha$ -Ems y  $\alpha$ -Abd-A. Sin embargo, en ambos casos solamente pudimos observar una señal basal de fondo (Fig.R.7F-G'). De estos resultados concluimos que en tanto en embriones silvestres como mutantes para *Ubx*, *abd-A* debe expresarse a niveles bajos, indetectables con el anticuerpo que disponemos.

#### 4.2.2. La expresión ectópica de *Ubx* es suficiente para evitar la apoptosis de las CCAP-NEs de los segmentos del S1 al T2

Una vez estudiada la pérdida de función de *Ubx* pasamos a analizar el efecto de su expresión ectópica. Mientras que en embriones de estadio 17, la expresión ectópica de *Ubx* en NBs (*wor-Gal4 UAS-Ubx<sup>IAI</sup>*) da lugar a un fenotipo silvestre, la expresión ectópica en neuronas (*elav-Gal4 UAS-Ubx<sup>IAI</sup>*) provoca la aparición de neuronas CCAP/Bursicón extras en los segmentos más anteriores, del segmento S1 al segmento T2 (Fig.R.6Ñ, Z y tabla 1). Teñimos estos últimos embriones (*elav-Gal4 UAS-Ubx<sup>IAI</sup>*) con los anticuerpos  $\alpha$ -Bursicón y  $\alpha$ -Dac y constatamos que las neuronas CCAP/Bursicón ectópicas eran neuronas eferentes ya que mostraban expresión de Dac (Fig.R.7J,Ñ y tabla 1).



**Fig.R.7 Ubx o abd-A se requieren para evitar la apoptosis de las CCAP-NEs**

(A) Expresión de Ubx (verde) en el linaje temprano del NB3-5 marcado con Ems (rojo). (B-C) Expresión de Ubx (verde) y CCAP (rojo) en los hemineurómeros T3, A3 y A5 de embriones silvestres de estadio 17 (B) y larva 3 (C). (D) Expresión de Ubx (verde) y CCAP (rojo) en distintos hemineurómeros de embriones de estadio 17, silvestres (D) y *Ubx<sup>6.28</sup>* (E). (F-G) Expresión de Ubx (verde) y CCAP (rojo) en embriones de estadio 11, silvestres (F) y *Ubx<sup>6.28</sup>* (G). Se muestra un plano focal en el que se localiza el NB3-5 y otro en el que se observa las neuronas del linaje. El número del hemineurómero del que se muestra la ampliación viene indicado en la parte baja de cada imagen. (H-M) Expresión de Bursicón en el SNC de embriones *Ubx<sup>6.28</sup>* (H), *Ubx<sup>MX6</sup> abd-A<sup>M1</sup>* (I), *elav-Gal4 UAS-Ubx<sup>IAI</sup>* (J), *Df(3L)H99* (K), *Df(3L)H99 Ubx<sup>6.28</sup>* (L) y *elav-Gal4 UAS-Abd-A<sup>20-10-1</sup>* (M). En la parte baja de la imagen se muestra la ampliación del segmento señalado por la punta de flecha donde se observa la expresión de Bursicón (rojo) y Dac (verde). Los círculos blancos indican la presencia de una CCAP-IN (IN) o una CCAP-NE (NE). Se indica en cada caso el número de segmento ampliado. (N) Esquemas en los que se representa la expresión de Bursicón en la mitad derecha de una CNV en los distintos genotipos estudiados. La barra vertical indica la línea media. S: subesófago, T: tórax, A1: abdominal A1, A7: abdominal A7.

Para analizar la función llevada a cabo por *Ubx* en estas neuronas estudiamos el patrón de expresión de Bursicón en individuos en los cuales no se produce apoptosis. La deficiencia *Df(3L)H99* elimina los tres genes responsables de la apoptosis en *Drosophila melanogaster*, *reaper* (*rpr*), *head involution defective* (*hid*) y *grim* (White et al., 1994), por lo que teñimos embriones de estadio 17 portadores de esta deficiencia con los anticuerpos  $\alpha$ -Bursicón y  $\alpha$ -Dac (Fig.R.7K,Ñ y tabla 1). Observamos CCAP-NEs ectópicas en los segmentos S1-T2, el mismo fenotipo que obtuvimos al expresar ectópicamente *Ubx* en neuronas (*elav-Gal4 UAS-Ubx<sup>JA1</sup>*). Por último, expresamos ectópicamente *Ubx* en embriones *Df(3L)H99* y de igual modo, al teñirlos con los anticuerpos  $\alpha$ -Bursicón y  $\alpha$ -Dac observamos CCAP-NEs ectópicas en los segmentos anteriores (Fig.R.7L,Ñ y tabla 1). Estos resultados sugieren, que en individuos silvestres, las CCAP-NEs de los segmentos S1-T2 mueren por apoptosis y que esta puede ser rescatada mediante la expresión de *Ubx*.

#### 4.2.3. La expresión ectópica de *abd-A* causa la pérdida de las neuronas CCAP/Bursicón

Teniendo en cuenta el papel redundante de *Ubx* y *abd-A* en la especificación de las neuronas CCAP/Bursicón, quisimos comprobar si la expresión ectópica de *abd-A* era, al igual que la de *Ubx*, capaz de evitar la apoptosis de las CCAP-NEs de los segmentos más anteriores. Para ello expresamos ectópicamente *abd-A* en neuronas (*elav-Gal4 UAS-abd-A<sup>20-10-1</sup>*) y teñimos embriones de estadio 17 con este genotipo con los anticuerpos  $\alpha$ -Bursicón y  $\alpha$ -Dac. En esas condiciones observamos una pérdida prácticamente total de las neuronas CCAP/Bursicón (Fig.R.7M,Ñ y tabla 1). Repetimos el experimento pero criando los embriones a 17°C con el fin de expresar *abd-A* a niveles más bajos. En este caso observamos un fenotipo silvestre (datos no mostrados).

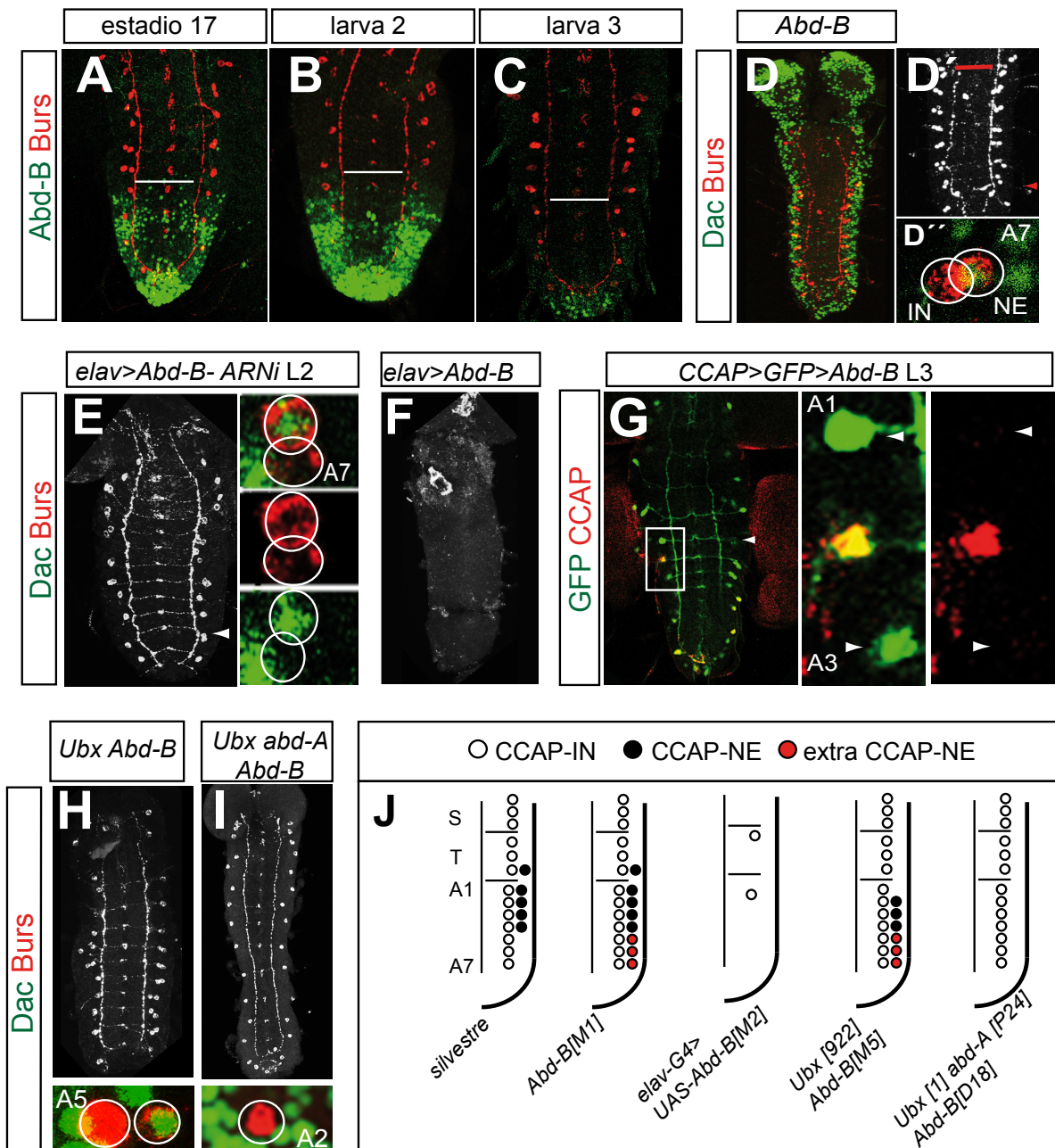
### 4.3. *Abd-B* reprime la expresión de los neuropéptidos CCAP y Bursicón en las CCAP-NEs tardías

De acuerdo con los resultados de Veverysta *et al.*, las CCAP-NEs tardías, presentes en los segmentos A4-7 se generan durante la neurogénesis embrionaria pero no expresan ningún neuropéptido hasta el estadio de pupa (Veverysta y Allan, 2013). No obstante, en este trabajo identificamos por primera vez estas células en larvas de tercer estadio (Fig.R.1A-B''). Dado que en ningún caso podemos identificar estas neuronas en embriones de estadio 17, cabe preguntarse por qué las CCAP-NEs tardías sufren un retraso en su diferenciación. *Abd-B* se expresa siguiendo un gradiente creciente desde segmento A5 hasta el segmento A9 (Celniker et al., 1989), por lo que podría ser el responsable de las diferencias existentes entre las CCAP-ENs tempranas, presentes en los segmentos T3-A4 y las CCAP-ENs tardías, presentes en los segmentos A5-A7.

#### 4.3.1. Expresión de *Abd-B* a lo largo del desarrollo

Con el fin de estudiar la expresión de *Abd-B* y ponerla en relación con el patrón de neuronas CCAP/





**Fig. R.8. Abd-B reprime la expresión de los neuropéptidos CCAP y Bursicón en las CCAP-NE tardías y evita su muerte por apoptosis**

(A-C) Expresión de Abd-B (verde) y Bursicón (rojo) en el parte final de la CNV de embriones de estadio 17 (A), larva de segundo estadio (B) y larva de tercer estadio (C). La barra blanca indica el comienzo del segmento A5. (D-D'') Expresión de Dac (verde) y Bursicón (rojo) en el SNC de un embrión de estadio 17 *Abd-B<sup>M1</sup>*. Se muestra el SNC central completo (D), una ampliación de los segmentos abdominales (la barra roja indica el comienzo del segmento A1) (D'), y una ampliación del segmento A7 marcado en la imagen anterior con la punta de flecha rojo. Se señala la presencia de una CCAP-IN (IN) y una CCAP-NE (NE) mediante círculos blancos (D''). (E) Expresión de Dac (verde) y Bursicón (rojo) en una larva de segundo estadio *elav-Gal4 UAS-Abd-B ARNi* crecida a 29°C. Se muestra la ampliación del segmento A7 así como los canales rojo y verde por separado. (F) Expresión de Dac (verde) y Bursicón (rojo) en el SNC de una larva de segundo estadio *elav-Gal4 UAS-Abd-B<sup>m25G19</sup>* crecida a 29°C. (G) Expresión de GFP (verde) y CCAP (rojo) en el SNC de una larva de tercer estadio *CCAP-Gal4 UAS-GFP UAS-Abd-B<sup>m25G19</sup>*. Se muestra una ampliación de la sección marcada por el rectángulo blanco, correspondientes a los segmentos A1-3, así como el canal rojo por separado. Las puntas de flechas señalan neuronas CCAP/Bursicón marcadas con GFP pero que no expresan CCAP. (H) Expresión de Dac (verde) y Bursicón (rojo y gris) en el SNC de embriones de estadio 17 *Ubx<sup>922</sup> Abd-B<sup>M5</sup>* (H) y *Ubx<sup>1</sup> abd-A<sup>p24</sup> Abd-B<sup>D18</sup>* (I). Se muestra una ampliación del segmento A5 y A2 respectivamente. (J) Esquemas en los que se representa la expresión de Bursicón en la mitad derecha de una CNV en los distintos genotipos estudiados. La barra vertical indica la línea media. S: subesófago, T: tórax, A1: abdominal A1, A7: abdominal A7.

Bursicón, realizamos tinciones de embriones de estadio 17 y larvas de segundo y tercer estadio silvestres con los anticuerpos  $\alpha$ -Abd-B y  $\alpha$ -Bursicón. Tanto en embriones tardíos como en larvas de segundo estadio observamos expresión de Abd-B desde el segmento A5 hasta el final del la CNV. Sin embargo, en larvas de tercer estadio observamos una expresión de Abd-B era más débil y únicamente pudimos detectarla a partir del segmento A8 (Fig.R.8A-C). Si bien es cierto que Garaulet *et al.* (Garaulet et al., 2014) describen en larvas de tercer estadio una señal más fuerte de Abd-B de la que nosotros observamos, estos autores realizan las tinciones con un anticuerpo  $\alpha$ -Abd-B diferente al que nosotros hemos utilizado. La diferente afinidad de los anticuerpos puede dar cuenta de las diferencias entre ambas observaciones. Con las herramientas de las que disponemos, nosotros encontramos una disminución de la señal de Abd-B a lo largo del desarrollo que coincide temporalmente con la activación de la expresión de CCAP y Bursicón en las neuronas CCAP-NEs tardías, además no observamos expresión de Abd-B en las neuronas CCAP/Bursicón.

#### 4.3.2. La falta de función de *Abd-B* permite la diferenciación de las CCAP-NEs tardías al final de la embriogénesis

Analizamos la falta de función de Abd-B tiñendo embriones mutantes para *Abd-B* (*Abd-B<sup>M1</sup>*) de estadio 17 con los anticuerpos  $\alpha$ -Bursicón y  $\alpha$ -Dac. De este modo, observamos la aparición de las CCAP-NEs tardías en los segmentos A4-A7 (Fig.R8D-D'', J tabla 1). Encontramos el mismo fenotipo al expresar el ARN de interferencia de *Abd-B* en neuronas (*elav-Gal4 UAS-Abd-B-ARNi<sup>12024</sup>*) (Fig.R.8E y tabla 1). En este caso realizamos la tinción en un momento más avanzado del desarrollo, en larva de segundo estadio, para garantizar que ARN de interferencia funcionase correctamente.

#### 4.3.3. La expresión ectópica de *Abd-B* impide la diferenciación de todas las neuronas CCAP/Bursicón

Paralelamente, expresamos *Abd-B* ectópicamente en neuronas (*elav-Gal4 UAS-Abd-B<sup>m2SG19</sup>*). Embriones de estadio 17 con este genotipo y teñidos con anticuerpos que reconocen las proteínas Bursicón y Dac no presentaron ninguna neurona CCAP/Bursicón (Fig.R.8F, J y tabla 1). Asimismo, analizamos si *Abd-B* era capaz de reprimir la expresión de los neuropéptidos CCAP y Bursicón una vez que las neuronas ya habían adquirido su identidad final expresando ectópicamente *Abd-B* con *CCAP-Gal4*. *CCAP-Gal4* empieza a expresarse en larva de segundo estadio por lo que teñimos larvas de tercer estadio *CCAP-Gal4 UAS-Abd-B<sup>m2SG19</sup> UAS-GFP* con los anticuerpos  $\alpha$ -CCAP y  $\alpha$ -GFP. En una misma CNV encontramos tres situaciones distintas: en ciertos segmentos observamos las neuronas CCAP/Bursicón mediante la señal de CCAP y GFP; en otros no pudimos localizar las neuronas ya que carecían de expresión de ambas proteínas; por último, encontramos neuronas con señal de GFP pero no de CCAP (Fig.R.8G). Es posible que la proteína GFP se exprese en mayor cantidad o bien tenga una vida media más larga que el péptido CCAP y por tanto perdure durante más tiempo. En ambos casos, los resultados obtenidos sugieren que Abd-B es capaz de reprimir la expresión del neuropéptido CCAP en neuronas completamente diferenciadas.

#### 4.3.4. *Ubx* y *abd-A* evitan la apoptosis de las CCAP-NEs tardías

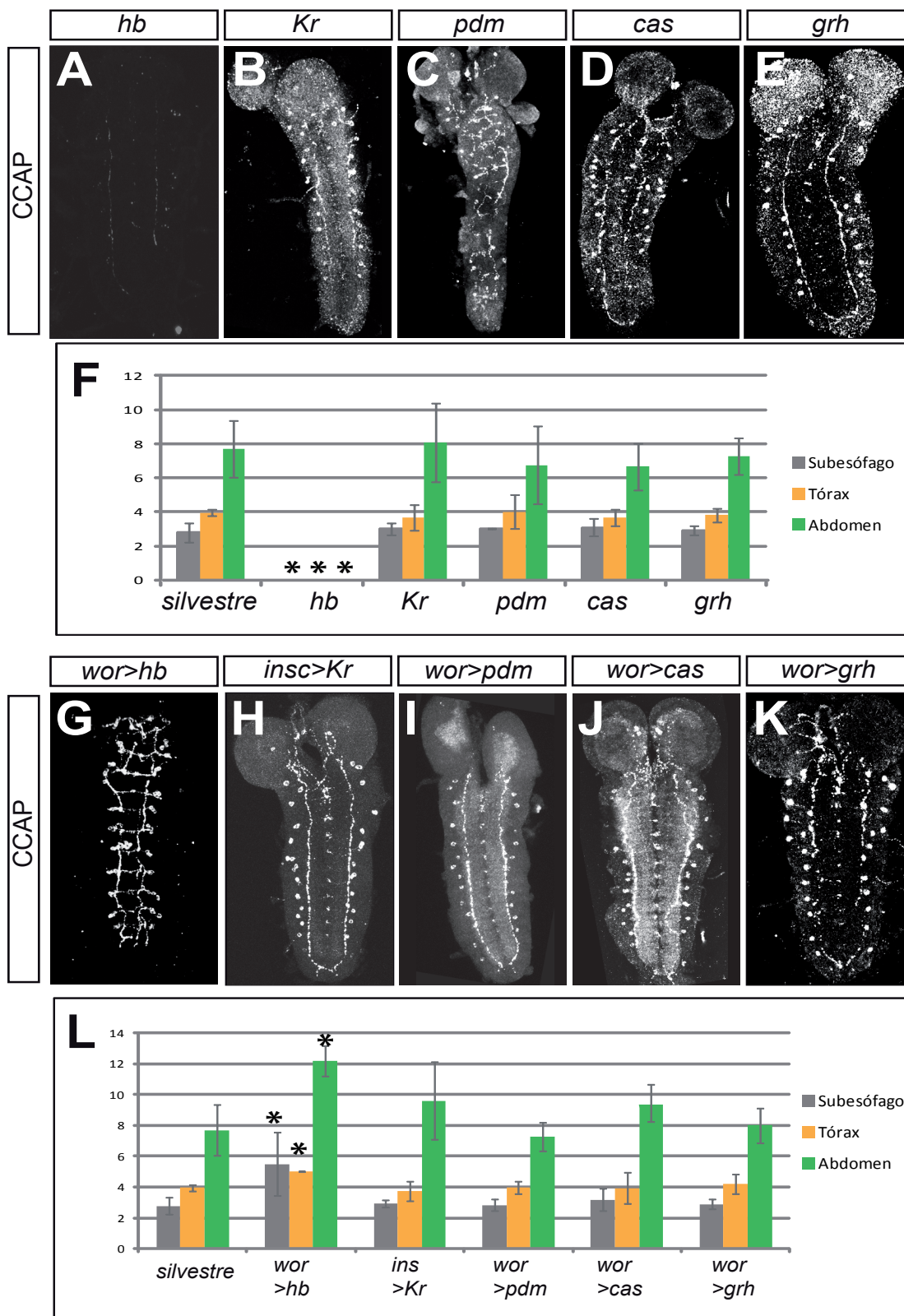
Nuestros resultados anteriores indican que se requiere la expresión de *Ubx* para evitar la apoptosis de las CCAP-NEs de los segmentos T3-A4. Teniendo en cuenta que *Ubx* se expresa en el linaje temprano del NB3-5 desde el segmento T3 al A7, es posible que también se requiera para la supervivencia de las CCAP-NEs de los segmentos A5-7. Para comprobar esta hipótesis teñimos embriones de estadio 17 *Ubx<sup>922</sup> Abd-B<sup>M5</sup>* con los anticuerpos  $\alpha$ -Bursicón y  $\alpha$ -Dac. En estas condiciones identificamos una CCAP-EN por hemisegmento, desde el A2 al A7 y una CCAP-IN en todos los hemisegmentos de la CNV (Fig.R.8H, J y tabla 1). *Abd-B<sup>M5</sup>* es una mutación puntal que afecta al gen *Abd-B* pero no al ARN no codificante *iab-8* (Foronda et al., 2006). Se ha descrito que en el sistema nervioso embrionario la falta de función de *Abd-B* no altera la expresión de *abd-A* (Gummalla et al., 2012), por lo tanto inferimos que *abd-A* está rescatando la muerte de las CCAP-ENs de los segmentos A2-A7. Para comprobarlo teñimos embriones de estadio 17 mutantes para *Ubx*, *abd-A* y *Abd-B* (*Ubx<sup>1</sup> abd-A<sup>P24</sup> Abd-B<sup>D18</sup>*) con los anticuerpos  $\alpha$ -Bursicón y  $\alpha$ -Dac. En este caso no observamos ninguna CCAP-NE (Fig.R.8I, J y tabla 1) mientras que el patrón de CCAP-INs no se vio afectado. Estos resultados sugieren que se requiere de la expresión *Ubx* o *abd-A* para evitar la muerte de las CCAP-NEs de los segmentos A5-7.

## 5. Identificación de la ventana temporal en la que se generan las células CCAP/Bursicón

Los genes temporales, *hb*, *Kr*, *Pdm*, *cas* y *grh*, se expresan de forma secuencial en los NBs, otorgándoles a estos la facultad de generar CMGs con distintas identidades. Los NBs originan de esta forma distintos destinos neuronales en función del gen temporal que expresen en cada momento. Determinar la ventana temporal en la que se generan las neuronas CCAP/Bursicón supone identificar uno de los genes maestros implicados en su especificación así como poner en relación estas neuronas con el resto de células del linaje.

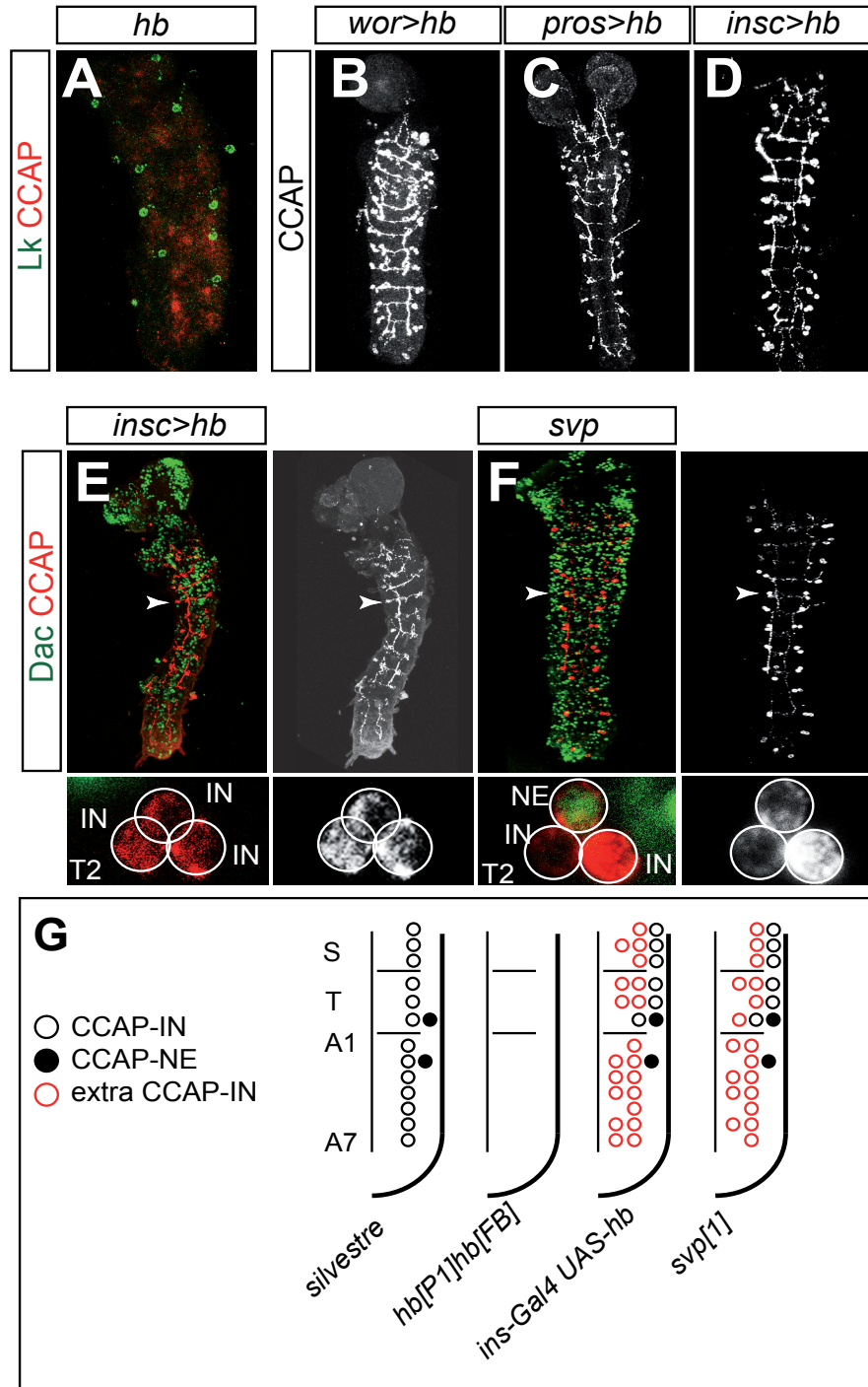
### 5.1. Las células CCAP/Bursicón se generan en la ventana Hb

Como primera aproximación, estudiamos el patrón de neuronas CCAP/Bursicón en embriones mutantes para cada uno de los genes temporales. Teñimos estos embriones de estadio 17 con anticuerpo  $\alpha$ -CCAP y observamos un fenotipo silvestre en todos ellos salvo en los mutantes para *hb* (*hb<sup>P1</sup> hb<sup>FB</sup>*). Estos embriones no presentaron ninguna neurona CCAP/Bursicón (Fig.R9A-F y tabla 1). Para comprobar estos datos examinamos el efecto de la expresión ectópica en NBs de los distintos genes temporales. Solo en el caso de *hb* (*wor-Gal4 UAS-hb<sup>F4A</sup>*) obtuvimos un fenotipo diferente del silvestre que detallaremos a continuación (Fig.R9G-L y tabla 1). Los embriones *wor-Gal4 UAS-Kr* no llegaron a estadio 17 por lo que expresamos ectópicamente *Kr* con línea *insc-Gal4*, la cual también dirige específicamente la expresión de *Kr* en NBs.



**Fig.R.9. Identificación de la ventana temporal en la que se generan las neuronas CCAP/Bursicón**  
 (A-E) Expresión de CCAP en el SNC de embriones mutantes de estadio 17 *hb*<sup>1</sup> *hb*<sup>FB</sup> (A), *Kr*<sup>1</sup> *Kr*<sup>CD</sup> (B), *Df*(2L) *ED773* (*pdm*) (C), *cas*<sup>D1</sup> (D), *grh*<sup>IM</sup> (E). (F) Histograma en el que se indica el número medio de neuronas CCAP/Bursicón en el subesófago, tórax y abdomen en los fenotipos anteriores. (G-K) Expresión de CCAP en el SNC de embriones de estadio 17 en los que se expresó ectópicamente con *wor*-Gal4 *UAS-hb*<sup>F4A</sup> (G), *UAS-Kr* (en este caso se utilizó *insc*-Gal4) (H), *UAS-pdm* (I), *UAS-cas* (J), *UAS-grh* (K). (L) Histograma en el que se indica el número medio de neuronas CCAP/Bursicón en el subesófago, tórax y abdomen en los fenotipos anteriores. Las barras de error representan las desviaciones típicas de la media. El asterisco señala los casos en los que las diferencias con los individuos silvestres son significativas (p-valor<0.001).





**Fig.R.10. Las neuronas CCAP se generan en la ventana temporal Hb**

(A) Expresión de Lk (verde) y CCAP (rojo) en el SNC de un embrión de estadio 17 *hb<sup>1</sup> hb<sup>FB</sup>*. (B-D) Expresión de CCAP (gris) en el SNC de embriones en los que se expresó ectópicamente *hb* (*UAS-hb<sup>FAA</sup>*) con *wor-Gal4* (B), *pros-Gal4* (C) y *insc-Gal4* (D). (E) Expresión de Dac (verde) y CCAP (rojo) en el SNC de un embrión de estadio 17 *insc-Gal4 UAS-hb<sup>FAA</sup>*. Se muestra la ampliación de un segmento T2, señalado con la punta de flecha en el que se observan 3 CCAP-INs (INs). Se muestra también el canal rojo por separado. (F) Expresión de Dac (verde) y CCAP (rojo) en el SNC de un embrión de estadio 17 *svp<sup>1</sup>*. Se muestra la ampliación de un segmento T2, señalado con la punta de flecha en el que se observan 2 CCAP-INs (INs) y 1 CCAP-NE (NE). Se muestra también el canal rojo por separado. (G) Esquemas en los que se representa la expresión de CCAP en la mitad derecha de una CNV en los distintos genotipos estudiados. La barra vertical indica la línea media. S: subesófago, T: tórax, A1: abdominal A1, A7: abdominal A7.



### 5.1.1 La pérdida de función de *hb* provoca la pérdida de las neuronas CCAP/Bursicón

En el experimento previamente descrito observamos que la falta de función de *hb* provoca la pérdida de todas las neuronas CCAP/Bursicón. Dado que la viabilidad de estos mutantes está gravemente afectada usamos como control las neuronas ABLKs, procedentes de la ventana Cas e identificables por la expresión del neuropéptido Leucoquinina (Estacio-Gomez et al., 2013). Teñimos embriones de estadio 17 mutantes para *hb* (*hb<sup>FB</sup> hb<sup>l</sup>*) con anticuerpos que reconocen los neuropéptidos Leucoquinina y CCAP respectivamente. Estos embriones mostraron un patrón silvestre de ABLKs a la vez que la pérdida de todas las neuronas CCAP/Bursicón (Fig.R.10A, G).

### 5.1.2. La expresión ectópica de *hb* da lugar a CCAP-INs ectópicas en todos segmentos

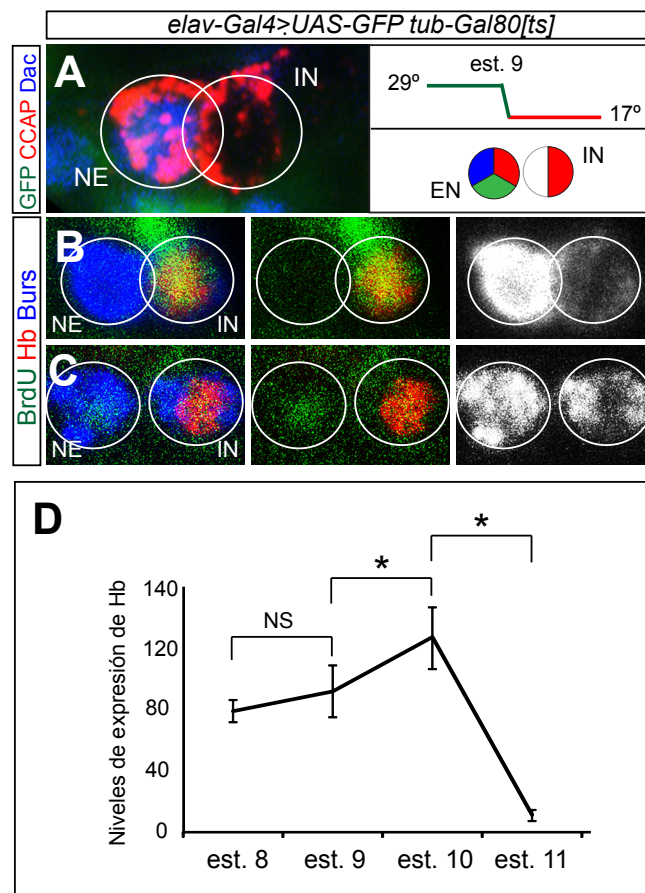
Expresamos ectópicamente *hb* con diferentes líneas Gal4 cuya expresión en el sistema nervioso se restringe a los NBs, *worniu* (*wor*) -Gal4, *prospero* (*prosp*) -Gal4 e *inscutable* (*insc*) -Gal4. En todos los casos, al realizar tinciones con el anticuerpo  $\alpha$ -CCAP en embriones de estadio 17 observamos la aparición de células CCAP/Bursicón extras en todos los segmentos de la CNV (Fig.R.10B-D y tabla 1). Para estudiar este fenotipo con mayor detalle teñimos embriones *insc-Gal4 UAS-hb* con los anticuerpos  $\alpha$ -CCAP y  $\alpha$ -Dac. Elegimos esta combinación genética ya que fue la que generó un fenotipo más severo. Observamos que las neuronas CCAP/Bursicón ectópicas no expresaban Dac, indicando que se trataba de CCAP-INs (Fig.R.10E,G y tabla 1). De este análisis concluimos que se estaba añadiendo de una a dos CCAP-INs por hemisegmento al patrón de expresión silvestre de las neuronas CCAP/Bursicón. Obtuvimos el mismo fenotipo al teñir embriones de estadio 17 mutantes para *seven up* (*svp<sup>l</sup>*) con el anticuerpo  $\alpha$ -CCAP (Fig.R.10F,G y tabla 1). *svp* codifica un receptor nuclear necesario para cerrar la ventana Hb (Grosskortenhaus et al., 2005) (Kanai et al., 2005) (Mettler et al., 2006), con lo que en mutantes *svp* la expresión de Hb se mantiene por más tiempo en el NB. Cabe esperar por tanto que estos mutantes muestren un fenotipo similar a la expresión ectópica de *hb*.

Es importante señalar que al expandir la ventana Hb, bien con *insc-Gal4 UAS-hb* o con *svp<sup>l</sup>*, se generan CCAP-INs ectópicas sin afectar al número de CCAP-NEs. La expansión de una ventana temporal da lugar a la generación de CMGs adicionales, las cuales a su vez, originan neuronas ectópicas. Por lo tanto, estos resultados sugieren que las CCAP-INs y las CCAP-NEs se originan a partir de CMGs diferentes. Analizaremos estos datos más adelante cuando estudiemos la implicación de la ruta de Notch en la especificación de las neuronas CCAP/Bursicón.

## 5.2. Las CCAP-NEs se generan antes que las CCAP-INs

Los resultados presentados hasta este punto sugieren que tanto las CCAP-INs como las CCAP-NEs

se generan a partir del mismo progenitor, el NB 3-5, en la misma ventana temporal, la ventana Hb, pero a partir de distintas CMGs. Como primer paso para dilucidar qué mecanismo está permitiendo que estas dos neuronas adquieran diferentes destinos, y por tanto, qué mecanismo está subdividiendo la ventana Hb, nos planteamos determinar la secuencia temporal de generación de estas dos neuronas. Para ello cruzamos la línea de moscas *elav-Gal4 tub-Gal80<sup>ts</sup>* con la línea *UAS-GFP* (ver material y métodos). De esta forma marcamos únicamente las neuronas generadas tempranamente activando la proteína Gal4 hasta el estadio 9. Teñimos los embriones resultantes del cruce con los anticuerpos  $\alpha$ -CCAP,  $\alpha$ -GFP y  $\alpha$ -Dac y encontramos hemineurómeros en los que solo la CCAP-NE presentaba señal de GFP. También encontramos situaciones en las que ambas células o ninguna de ellas estaba marcada con  $\alpha$ -GFP (Fig.R.11A). De estos datos concluimos que la CCAP-NE se generó antes que la CCAP-IN.



**Fig.R.11. La CCAP-NE se genera antes que la CCAP-IN y los niveles de expresión de Hb aumentan en el NB3-5**

**(A)** Expresión de GFP (verde), CCAP (rojo) y Dac (azul) en un hemineurómero de un embrión *elav-Gal4 UAS-GFP tub-Gal80<sup>ts</sup>* crecido a 30°C hasta estadio 9 y a 17°C hasta estadio 17. En la parte derecha de la imagen se muestra un esquema del experimento y de los patrones de expresión. **(B-C')** Expresión de BrdU (verde), Hb (rojo) y Bursicón (azul) en embriones de estadio 17 inyectados en estadio 9 con una solución de BrdU. En **(B)** se muestra un hemisegmento en el cual únicamente CCAP-IN ha incorporado BrdU y en **(C)** otro en el cual tanto la CCAP-IN como la CCAP-NE han incorporado la solución de BrdU. Los círculos blancos señalan la presencia de la CCAP-IN (IN) y de la CCAP-NE (NE). Se presentan los canales verde y rojo, y azul por separado. **(D)** Niveles de expresión de Hb en el NB3-5 en embriones de estadio 8, 9, 10 y 11. Los niveles de expresión se calcularon con la ayuda del programa ImageJ y corresponden al valor medio de grises multiplicado por el área dividido por 1000.

Para reforzar este resultado, inyectamos embriones de estadio 9 con una solución de 5-bromo-2'-desoxiuridine (BrdU) (ver material y métodos). La BrdU se incorpora en el ADN de células en división, una vez incorporada es heredada por su progenie. Si las CCAP-INs y las CCAP-NEs no proceden de una misma CMG, la inyección puede producirse tras la generación de la primera neurona CCAP/Bursicón y antes de la generación de la segunda. En este caso, solo la célula originada en segundo lugar aparecerá marcada con BrdU. Después de dejar que los embriones inyectados se desarrollasen hasta el estadio 17 y teñirlos con los anticuerpos  $\alpha$ -CCAP,  $\alpha$ -Hb y  $\alpha$ -BrdU, encontramos hemisegmentos donde solo la CCAP-IN apareció marcada con BrdU (Fig.R.11B). También encontramos situaciones en las cuales ambas células resultaron marcadas (Fig.R.11C). Para identificar las CCAP-INs nos servimos de la expresión de Hb, ya que mientras que en la CCAP-IN los niveles de expresión de Hb son altos, en la CCAP-EN son bajos o inapreciables (ver resultados expuestos más adelante).

De estos experimentos y del análisis del linaje del NB3-5 anteriormente presentado (apartado 3), concluimos que durante la ventana temporal Hb, el NB 3-5 genera dos CMGs, la primera de las cuales da lugar a la CCAP-NE y la segunda a la CCAP-IN.

### **5.3. Los niveles de expresión Hb aumentan en el NB 3-5 a lo largo de su ventana**

Nuestro siguiente objetivo fue entender por qué estas dos CMGs generan neuronas con identidades diferentes. Pearson *et al.* sugieren que en el NB 7-1 los niveles de expresión de *hb* disminuyen a lo largo de su propia ventana permitiendo de este modo la generación de diferentes destinos neuronales (Pearson y Doe, 2003). Para examinar si esto mismo sucede en el NB 3-5 medimos los niveles de expresión de Hb en este NB tiñendo embriones silvestres de estadio 8 a 10 con los anticuerpos  $\alpha$ -Hb y  $\alpha$ -Ems. En el microscopio confocal, tomamos imágenes del NB 3-5 en distintos estadios y calculamos la intensidad de fluorescencia del anticuerpo  $\alpha$ -Hb con la ayuda del programa de análisis de imagen ImageJ (ver material y métodos). Los datos que obtuvimos revelaron que en el caso del NB 3-5 los niveles de expresión de *hb* aumentan de estadio 8 hasta el estadio 10, a partir del en el cuál caen drásticamente. Esta caída corresponde con el comienzo de ventana Kr (Fig.R.11D).

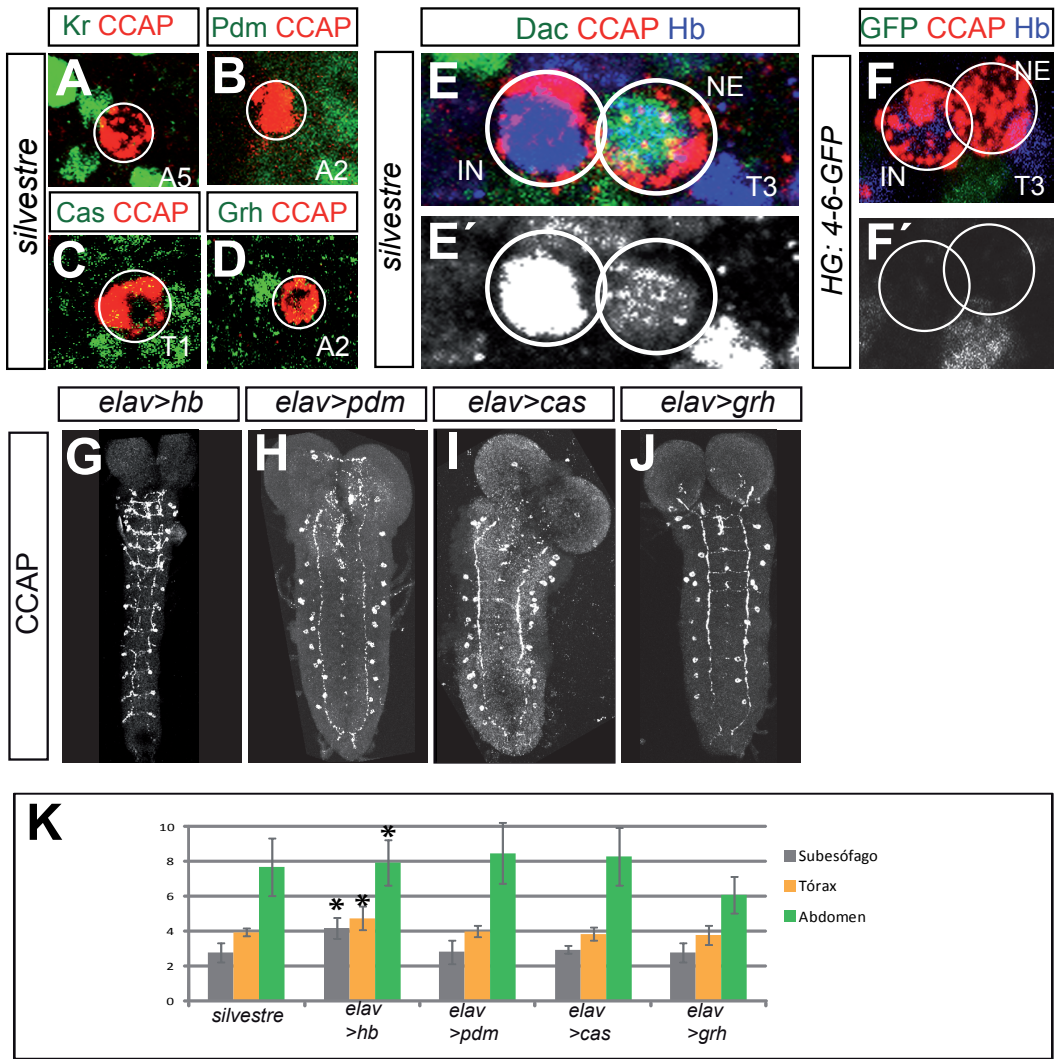
### **5.4. Diferentes niveles de expresión de Hb distinguen la CCAP-IN de la CCAP-EN**

La expresión de los genes temporales se mantiene en las neuronas y células gliales generadas en cada ventana temporal (Isshiki et al., 2001). Nos preguntamos si las neuronas CCAP/Bursicón expresan alguno de ellos y si esta expresión es necesaria para su correcta especificación. En primer lugar estudiamos la expresión de genes temporales en estas neuronas tiñendo embriones silvestres de estadio 17 con anticuerpos que reconocen el neuropéptido CCAP y los distintos genes temporales. Como cabía esperar, las neuronas CCAP/Bursicón tan solo aparecieron marcadas con  $\alpha$ -Hb (Fig.R.12A-D), por

lo que decidimos analizar más detalladamente su patrón de expresión.

5.4.1. Las CCAP-NEs y CCAP-INs expresan bajos y altos niveles de Hb respectivamente

Teñimos embriones de estadio 17 con los anticuerpos  $\alpha$ -CCAP,  $\alpha$ -Hb y  $\alpha$ -Dac y observamos que tanto las CCAP-NEs como las CCAP-INs expresaban Hb. Este dato refuerza nuestros resultados anteriores según los cuales ambas neuronas se generan durante la ventana temporal Hb. Sin embargo, mientras que en las CCAP-INs los niveles de expresión de *hb* eran altos, en las CCAP-NEs eran bajos y en ocasiones indetectables (Fig.R.12E).



**Fig.R.12. Función de los genes temporales en las neuronas CCAP/Bursicón**  
(A-D) Expresión de CCAP (rojo) y de Kr (A), Pdm (B), Cas (C), Grh (D) (verde) en el SNC de embriones silvestre de estadio 17. El segmento del cual se muestra la ampliación se indica en la parte baja de cada imagen. (E-E') Expresión de Dac (verde), CCAP (rojo) y Hb (azul) en el SNC de un embrión de estadio 17. Se muestra el canal azul por separado. (F) Expresión de GFP (verde), CCAP (rojo) y Hb (azul) en el SNC de un embrión de estadio 17 *HG: 4-6- GFP*. En (F') se muestra el canal verde por separado. El círculo blanco indica la presencia de una neurona CCAP-IN (IN) o CCAP-NE (NE). (G-J) Expresión de CCAP en el SNC de embriones de estadio 17 en los que se expresó ectópicamente con *elav-Gal4 UAS-hb<sup>F4A</sup>* (G), *UAS-pdm* (H), *UAS-cas* (I), *UAS-grh* (J). (K) Histograma en el que se indica el número medio de neuronas CCAP/Bursicón en el subesófago, tórax y abdomen en los fenotipos anteriores. Las barras de error representan las desviaciones típicas de la media. El asterisco señala los casos en los que las diferencias con los individuos silvestres son significativas ( $p$ -valor < 0.001).

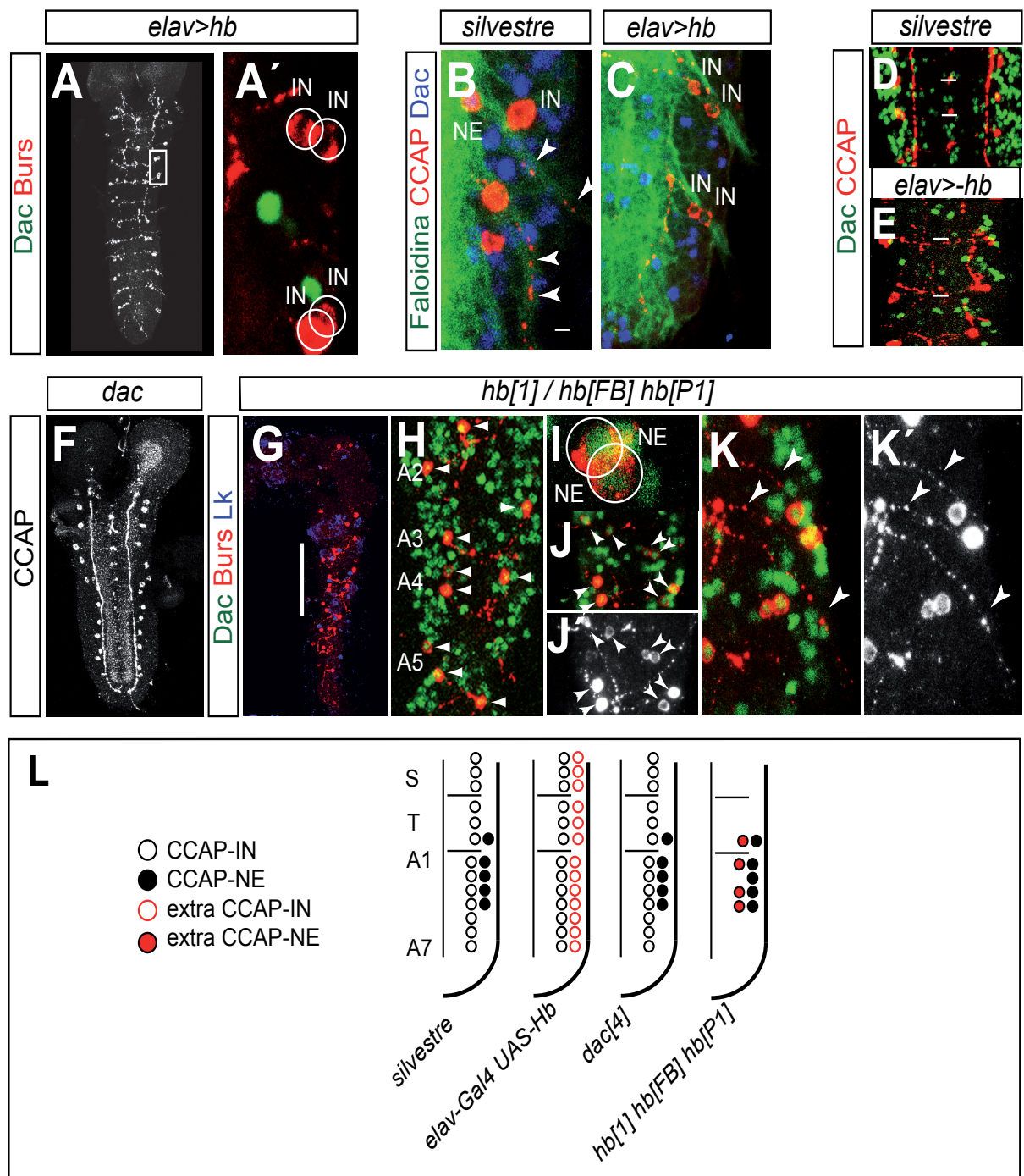
En un análisis de la región reguladora de *hb* se han identificaron diferentes dominios que dirigen la expresión del gen bien en el NB, bien en las células generadas por este (Hirono et al., 2012). Los autores de este estudio describen una región de 866 pares de bases (HG4-6) como la responsable de la expresión de este gen en neuronas tempranas. Nos preguntamos si la alta expresión de Hb en las CCAP-INs estaba controlada por esta región y para comprobarlo, teñimos embriones en los cuales la expresión de GFP está bajo control de la región HG4-6 (*Hb:HG4-6-GFP*) con los anticuerpos  $\alpha$ -CCAP y  $\alpha$ -GFP. No observamos colocalización de estos anticuerpos en ninguna de las células CCAP/Bursicón (Fig.R.12F), por lo que concluimos que la expresión de Hb en las CCAP-INs debe de estar dirigida por otra región reguladora todavía no identificada. Este resultado pone de manifiesto la complejidad de los mecanismos que regulan la expresión de *hb*.

#### 5.4.2. Niveles altos de *hb* en la neurona son suficientes para transformar las CCAP-ENs en CCAP-INs

Otra aproximación para estudiar la posible función de los genes temporales en las neuronas ya formadas fue expresar ectópicamente cada uno de ellos con *elav-Gal4*. Analizamos los fenotipos resultantes teñiendo embriones de estadio 17 con el anticuerpo  $\alpha$ -CCAP. La expresión ectópica de *Kr* no dio lugar a embriones viables de estadio 17 mientras que la de *Pdm*, *cas* y *grh* resultó en un fenotipo silvestre (Fig.R.12H-K y tabla 1). Sin embargo, al expresar ectópicamente *hb* observamos la presencia de dos células CCAP/Bursicón en todos los hemisegmentos de la CNV (Fig.R.12G, K y tabla 1). Para analizar con mayor precisión este fenotipo repetimos el experimento teñiendo esta segunda vez los embriones de estadio 17 con los anticuerpos  $\alpha$ -Bursicón y  $\alpha$ -Dac. Ninguna de las células marcadas con  $\alpha$ -Bursicón mostró expresión de Dac, por lo que concluimos que este genotipo mutante provoca la aparición de dos CCAP-INs por hemisegmento (Fig.R.13A-A', L). Para comprobar este resultado estudiamos la axonación de las neuronas CCAP/Bursicón teñiendo estos mismos embriones con los anticuerpos  $\alpha$ -CCAP y  $\alpha$ -Dac e incubándolos con faloidina, una micotoxina capaz de unirse a los microfilamentos de actina. No observamos ningún axón marcado con CCAP saliendo del SNC, algo que sí observamos en embriones silvestres (Fig.R.13B-C). Además encontramos neuronas CCAP/Bursicón ectópicas en los segmentos más anteriores (S1-T2), segmentos en los cuales, en condiciones silvestres, al no expresarse *Ubx* ni *abd-A*, las CCAP-NEs mueren por apoptosis. Estas observaciones apoyan la idea de que todas las neuronas CCAP/Bursicón que observamos en este genotipo son CCAP-INs. Cabe señalar que la expresión ectópica de *hb* causa la pérdida de expresión de Dac en un gran número de células de la CNV (Fig.R.13D-E). Comprobamos que la falta de función de Dac no alteraba el patrón de neuronas CCAP/Bursicón teñiendo embriones *dac<sup>4</sup>* con el anticuerpo  $\alpha$ -CCAP (Fig.R.13F y tabla 1), y concluimos que la pérdida de expresión de este marcador es una consecuencia del cambio de identidad de CCAP-NE a CCAP-IN que observamos en estas condiciones.

En conjunto, estos resultados indican que la CCAP-NE y la CCAP-IN adquieren distintas identidades debido en parte a los diferentes niveles de expresión de Hb que presentan, ya que la expresión ectópica de altos niveles de *hb* en las neuronas es capaz de transformar el destino en otro.





**Fig.R.13. Distintos niveles de expresión de Hb especifican la CCAP-NE y la CCAP-IN**

(A) Expresión de Bursicón (gris) en el SNC de un embrión de estadio 17 *elav-Gal4 UAS-hb<sup>FA4</sup>* (A') Ampliación de la sección señalada por el rectángulo blanco en la que se muestra la expresión de Dac (verde) y Bursicón (rojo). Se observa la presencia de dos CCAP-INS (IN) por hemisegmento, señaladas en la imagen con círculos blancos. (B-C) Expresión de Faloidina (verde), CCAP (rojo) y Dac (azul) en dos hemisegmentos del SNC de embriones de estadio 17 silvestres (B) y *elav-Gal4 UAS-hb<sup>FA4</sup>* (C). Las puntas de flecha indican la presencia de axones eferentes marcados con CCAP. (D-E) Expresión de Dac (verde) y CCAP (rojo) en 3 segmentos del SNC de embriones de estadio 17 silvestres (D) y *elav-Gal4 UAS-hb<sup>FA4</sup>* (E) Las barras blancas señalan la separación entre segmentos. (F) Expresión de CCAP en el SNC de un embrión de estadio 17 *dac<sup>d</sup>*. (G-K') Expresión de Dac (verde), Bursicón (rojo) y Lk (azul) en el SNC de embriones de estadio 17 *hb<sup>1</sup> / hb<sup>FB</sup> hb<sup>P1</sup>*. Imagen de un SNC completo (G), ampliación de 4 segmentos abdominales (H), los segmentos ampliados están indicados por la barra blanca. Las puntas de flecha señalan la presencia de CCAP-NEs. (I) Ampliación de un hemisegmento en el que se observa la presencia de dos CCAP-NEs (NE). (J-J') Ampliación de dos segmentos en el que se observa duplicaciones de CCAP-NEs señaladas con las puntas de flecha. (K-K') Ampliación de dos hemisegmentos en los que se observan axones eferentes marcados con Bursicón y señalados con la punta de flecha. (L) Esquemas en los que se representa la expresión de Bursicón y CCAP en la mitad derecha de una CNV en los distintos genotipos estudiados. La barra vertical indica la línea media. S: subesófago, T: tórax, A1: abdominal A1, A7: abdominal A7.

### 5.4.3. Niveles bajos de expresión *hb* impiden la generación de las CCAP- INs y dan lugar a CCAP-NEs ectópicas

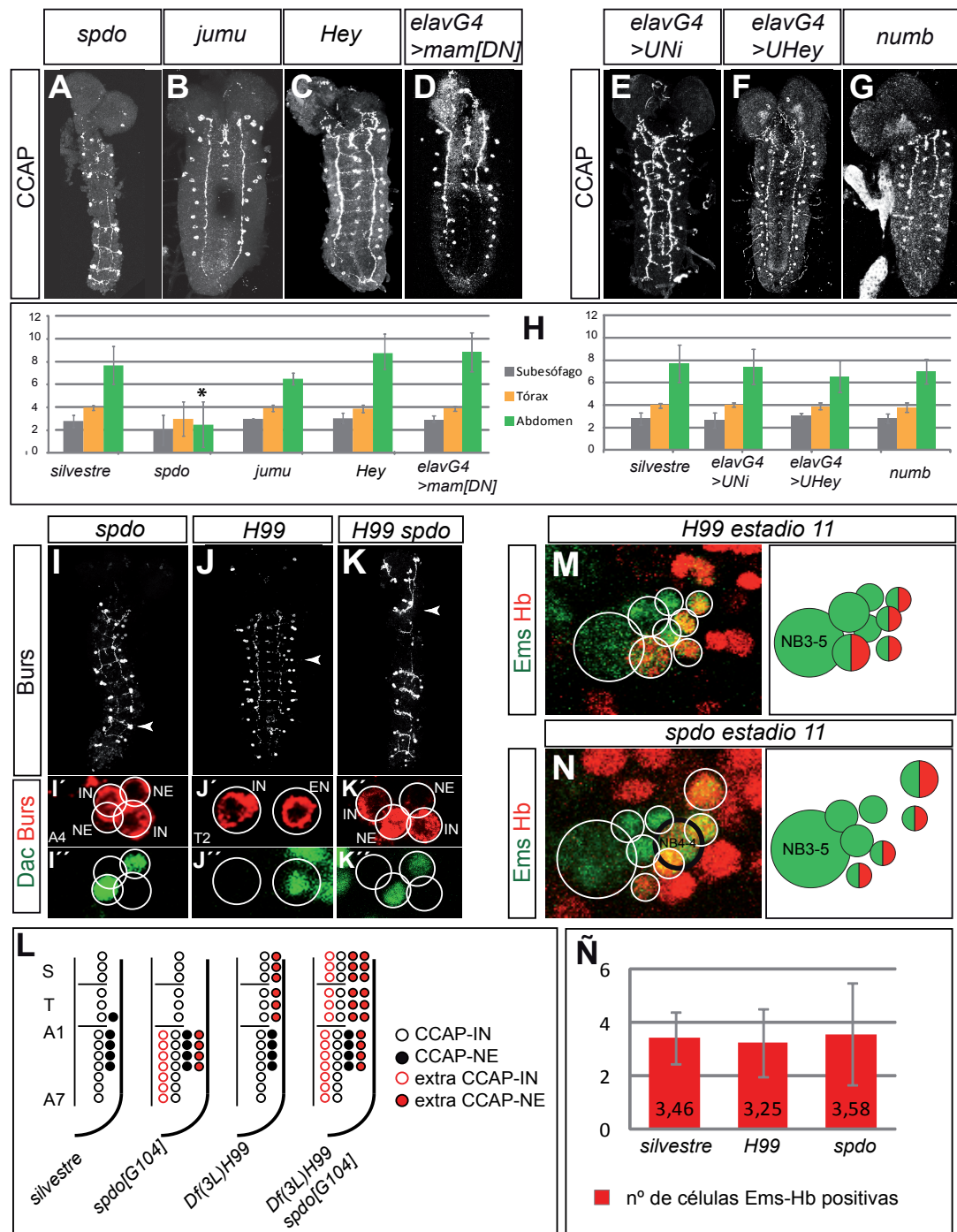
Dado que las CCAP-NEs parecen requerir bajos niveles de *hb* quisimos analizar el efecto de reducir el nivel de expresión de *hb* por lo que estudiamos el patrón de neuronas CCAP/Bursicón en una condición hipomorfa para *hb* (*hb<sup>1</sup>/hb<sup>FB</sup> hb<sup>P1</sup>*). Embriones de estadio 17 con esta combinación genética teñidos con los anticuerpos  $\alpha$ -Bursicón y  $\alpha$ -Dac no presentaron ninguna CCAP-INs. Observamos además que las CCAP-NEs no estaban afectadas y que en los hemisegmentos T3-A4 se generaban por duplicado. Utilizamos el patrón de expresión de las ABLKs en los segmentos A1-7 para identificar los distintos segmentos de la CNV y reconocimos las CCAP-NEs tanto por la expresión del marcador Dac como por la presencia de axones eferentes (Fig.R.13G-K y tabla 1). Concluimos que las CCAP-INs, al contrario que las CCAP-NEs, necesitan altos niveles de expresión de *hb* para que su correcta especificación. Además, la expresión de *hb* a bajos niveles es capaz de transformar en las CCAP-INs en CCAP-NEs.

## 6. Estudio de la ruta de Notch en la especificación del destino CCAP/Bursicón

Al dividirse, la CMG da lugar a dos células hermanas las cuales adoptan destinos distintos gracias a las decisiones binarias mediadas por la ruta de Notch (Skeath y Thor, 2003) (Lin y Lee, 2012). Este suceso es clave a la hora de generar un tipo neuronal concreto, por lo que decidimos estudiar su implicación en la especificación de las neuronas CCAP/Bursicón.

### 6.1. Efecto de la inactivación de la ruta de Notch en la neuronas CCAP/Bursicón

En primer lugar, probamos inactivar la ruta de Notch. Para ello estudiamos la falta de función de *spdo*, un gen necesario para la división asimétrica pero que no está implicado en el proceso de inhibición lateral por lo que no afecta a la delaminación de los NBs. Teñimos embriones mutantes para *spdo* (*spdo<sup>G104</sup>*) con el anticuerpo  $\alpha$ -CCAP. No pudimos observar ninguna CNV completa ya que el desarrollo de estos embriones está seriamente afectado. En los segmentos menos dañados identificamos neuronas CCAP/Bursicón ectópicas (Fig.R.14A, H y tabla 1). Para estudiar con más detalle este fenotipo teñimos estos mismos embriones con los anticuerpos  $\alpha$ -Bursicón y  $\alpha$ -Dac. De esta forma observamos la duplicación de las CCAP-NEs en los segmentos torácicos y abdominales, y de las CCAP-INs en todos los segmentos de la CNV (Fig.R.14I-I'', L y tabla 1). Este resultado sugiere que ambas neuronas requieren que la ruta de Notch esté inactiva para su correcta especificación. Además, el bloqueo de la ruta en sus células hermanas es suficiente para transformarlas en neuronas CCAP/Bursicón, bien CCAP-INs, bien neuronas CCAP-NEs. Por otra parte, este dato confirma que las neuronas CCAP-INs y CCAP-NEs no proceden de una misma CMG, ya que cada una tiene su célula hermana correspondiente.



**Fig.R.14. Estudio de la ruta de Notch en la especificación de las neuronas CCAP/Bursicón**

(A-G) Expresión de CCAP en el SNC de embriones de estadio 17 *spdo*<sup>G104</sup> (A), *jumu*<sup>06439</sup> (B), *Hey*<sup>06656</sup> (C), *elav-Gal4 UAS-mam*<sup>DN</sup> (D), *elav-Gal4 UAS-Nintra* (E), *elav-Gal4 UAS-Hey*<sup>Δ315</sup> (F), *numb*<sup>1</sup> (G). (H) Histograma en el que se indica el número medio de neuronas CCAP/Bursicón en el subesófago, tórax y abdomen en los fenotipos anteriores. Las barras de error representan las desviaciones típicas de la media. El asterisco señala los casos en los que las diferencias con los individuos silvestres son significativas (p-valor<0.001). (I, J y K) Expresión de Bursicón (gris) en el SNC de embriones de estadio 17 *spdo*<sup>G104</sup> (I), *Df(3L)H99* (J), *Df(3L)H99 spdo*<sup>G104</sup> (K). (I', J', K') Expresión de Dac (verde) y Bursicón (rojo) en un hemisegmento de los SNCs mostrados en (I, J y K). El segmento del cual se muestra una ampliación está señalado por la punta de flecha y está indicado en la parte baja de la imagen. (L) Esquemas en los que se representa la expresión de Bursicón en la mitad derecha de una CNV en los distintos genotipos estudiados. La barra vertical indica la línea media. S: subesófago, T: tórax, A1: abdominal A1, A7: abdominal A7. (M-N) Expresión de Ems (verde) y Hb (rojo) en una ampliación del hemisegmento izquierdo de embriones de estadio 11 *Df(3L)H99* (M), y *spdo*<sup>G104</sup> (N). En la imagen los círculos blancos señalan la presencia del NB3-5 y de las células de su linaje. En la parte derecha de la imagen se adjunta un esquema con los patrones de expresión. El círculo negro señala la presencia del NB4-4. (O) Histograma en el que se representa el número medio de células que expresan Ems y Hb por hemisegmento en embriones de estadio silvestres, 11 *Df(3L)H99* y *spdo*<sup>G104</sup>. Las barras de error indican la desviación típica de la media, la cual se indica en la parte baja de la barra. No existen diferencias significativas de los distintos genotipos mutantes con respecto a los individuos silvestres.



Otro gen implicado en la división asimétrica, es el factor de transcripción *jumeaux* (*jumu*<sup>06439</sup>) (Cheah et al., 2000). Sin embargo, en embriones de estadio 17 mutantes para *jumu* teñidos con el anticuerpo  $\alpha$ -CCAP observamos un fenotipo silvestre (Fig.R.14B, H y tabla 1). Se ha descrito que *jumu* es necesario para la segregación asimétrica de Numb y en su ausencia, las dos células procedentes de la primera CMG del NB 4-2 adoptan el mismo destino. Dado que este es el único ejemplo en el que se ha estudiado la función de *jumu*, es posible que esta no sea extrapolable a otros casos. Estudiamos también la falta de función de *Hey*, una de las dianas de la ruta de Notch (Monastirioti et al., 2010). Al igual que en el caso anterior, embriones *Hey*<sup>06656</sup> teñidos con el anticuerpo  $\alpha$ -CCAP mostraron un patrón silvestre de neuronas CCAP/Bursicón (Fig.R.14C, H y tabla 1). No se ha identificado ningún destino neuronal que se vea afectado por la falta de función de *Hey* (Monastirioti et al., 2010), por lo que este resultado era esperable. Por último, probamos bloquear la ruta de Notch expresando ectópicamente con *elav-Gal4* un dominante negativo de *mastermind*, uno de los activadores de los genes diana de la ruta. También en esta ocasión obtuvimos un fenotipo silvestre al teñir embriones *elav-Gal4 UAS-mam*<sup>DN</sup> con el anticuerpo  $\alpha$ -CCAP (Fig.R.14D, H y tabla 1). Es posible que *elav-Gal4* active la expresión de *UAS-mam*<sup>DN</sup> una vez que la neurona haya activado la ruta de Notch y que por lo tanto no sea capaz de alterar su destino final.

## 6.2. Efecto de la activación ectópica de la ruta de Notch en la neuronas CCAP/Bursicón

En primer lugar expresamos ectópicamente con *elav-Gal4* el dominio intracelular de Notch (*elav-Gal4 UAS-Nintra*), lo que equivale a activar constitutivamente la ruta en todas las neuronas. Estos embriones teñidos con el anticuerpo  $\alpha$ -CCAP mostraron un fenotipo silvestre (Fig.R.14E, H y tabla 1). Algo que también sucedió al expresar ectópicamente *Hey*, un factor bHLH-O diana de la ruta de Notch que tiene la capacidad de transformar un destino en otro en ausencia de Notch (Monastirioti et al., 2010) (Fig.R.14F, H y tabla 1). En ambos casos es posible *elav-Gal4* se active demasiado tarde para alterar el efecto de la ruta de Notch en la especificación de neuronas CCAP/Bursicón.

Por último, estudiamos la falta de función de *numb*. Embriones de estadio 17 mutantes para *numb* (*numb*<sup>1</sup>) teñidos con el anticuerpo  $\alpha$ -CCAP presentaron un fenotipo silvestre (Fig.R.14G, H y tabla 1). Numb es una proteína con un fuerte efecto materno y se ha descrito que su pérdida de función no afecta las células que se generan tempranamente en el SNC (Skeath y Doe, 1998). Sabiendo que las neuronas CCAP/Bursicón se generan antes del estadio 10, es esperable que su especificación no se vea alterada en estos mutantes.

A pesar de los resultados negativos obtenidos, el fenotipo observado en los embriones mutantes para *spdo* es suficientemente relevante como para concluir que las neuronas CCAP/Bursicón proceden de distintas CMGs y requieren el silenciamiento de la ruta de Notch para su especificación.

### 6.3. La apoptosis como posible destino de las células hermanas de las neuronas CCAP/Bursicón

Dado que la CCAP-NE y la CCAP-IN proceden de distintas CMGs, nos preguntamos qué destino adquieren sus células hermanas. Alrededor del 37% de las células generadas durante la neurogénesis embrionaria mueren por apoptosis (Rogulja-Ortmann et al., 2007). Además en un análisis del linaje del NB3-5, se observó que los embriones portadores de la deficiencia *Df(3L)H99* poseían más células que los embriones silvestres, concretamente de 2 a 7 células más en segmentos torácicos y 7 células más en segmentos abdominales. Sin embargo, no es de esperar que las hermanas de las neuronas CCAP/Bursicón mueran por apoptosis, como ya expusimos anteriormente, embriones portadores de la deficiencia *Df(3L)H99*, no presentaron duplicaciones los destinos CCAP-NEs y CCAP-INs (Fig.R.14J y tabla 1).

Para corroborar los datos obtenidos sobre la implicación de la ruta de Notch y la apoptosis teñimos embriones de estadio 17 portadores de la deficiencia *Df(3L)H99* y mutantes para *spdo* (*Df(3L)H99 spdo<sup>G104</sup>*) con los anticuerpos  $\alpha$ -Bursicón y  $\alpha$ -Dac. En esta ocasión observamos la duplicación de los dos destinos a lo largo de toda la CNV. De este modo, observamos dos CCAP-NEs y dos CCAP-INs en todos los hemisegmentos salvo en los hemisegmentos A5-7, en los cuales únicamente observamos dos CCAP-INs. Las CCAP-NEs silvestres de estos hemisegmentos comienzan a expresar Bursicón en larva de tercer estadio, por lo que es posible que se estén generando CCAP-NEs ectópicas en estos hemisegmentos y que estas no empiecen a expresar Bursicón hasta un momento más avanzado del desarrollo. El fenotipo observado en estas condiciones mutantes refuerza los datos anteriores según los cuales las CCAP-NEs de los segmentos anteriores muere por apoptosis y las células hermanas de las neuronas CCAP/Bursicón adoptan su mismo destino cuando se inactiva la ruta de Notch.

### 6.4. Estudio de la ruta de Notch y la apoptosis en el linaje del NB 3-5

Analizamos también el efecto de la inactivación de la ruta de Notch y de la apoptosis en el linaje temprano del NB 3-5. Con este fin teñimos embriones *spdo<sup>G104</sup>* y embriones *Df(3L)H99* de estadio 11 con los anticuerpos  $\alpha$ -Ems y  $\alpha$ -Hb. En ninguno de los dos casos observamos diferencias en el número de células Ems y Hb positivas con respecto a embriones silvestres (Fig.R.14M-Ñ). Estos resultados eran esperables ya que por una parte, en ese estadio no disponemos de herramientas que nos permitan diferenciar las neuronas CCAP/Bursicón de sus células hermanas y por otra, Rogulja-Ortmann *et al.* describen que en el SNC, la apoptosis comienza a producirse en embriones de estadio 11 (Rogulja-Ortmann et al., 2007).

## 7. Búsqueda de genes implicados en la especificación de las neuronas CCAP/Bursicón

Nuestro siguiente objetivo fue tratar de entender cómo los tres mecanismos básicos capaces de generar diversidad en el desarrollo de SNC: la determinación espacial, la determinación temporal y las decisiones binarias se integran y traducen para dar lugar a una neurona diferenciada. Con este fin, realizamos una búsqueda de genes necesarios para la adquisición del destino CCAP/Bursicón.

### 7.1. Factores de transcripción con una función o expresión conocida en el SNC

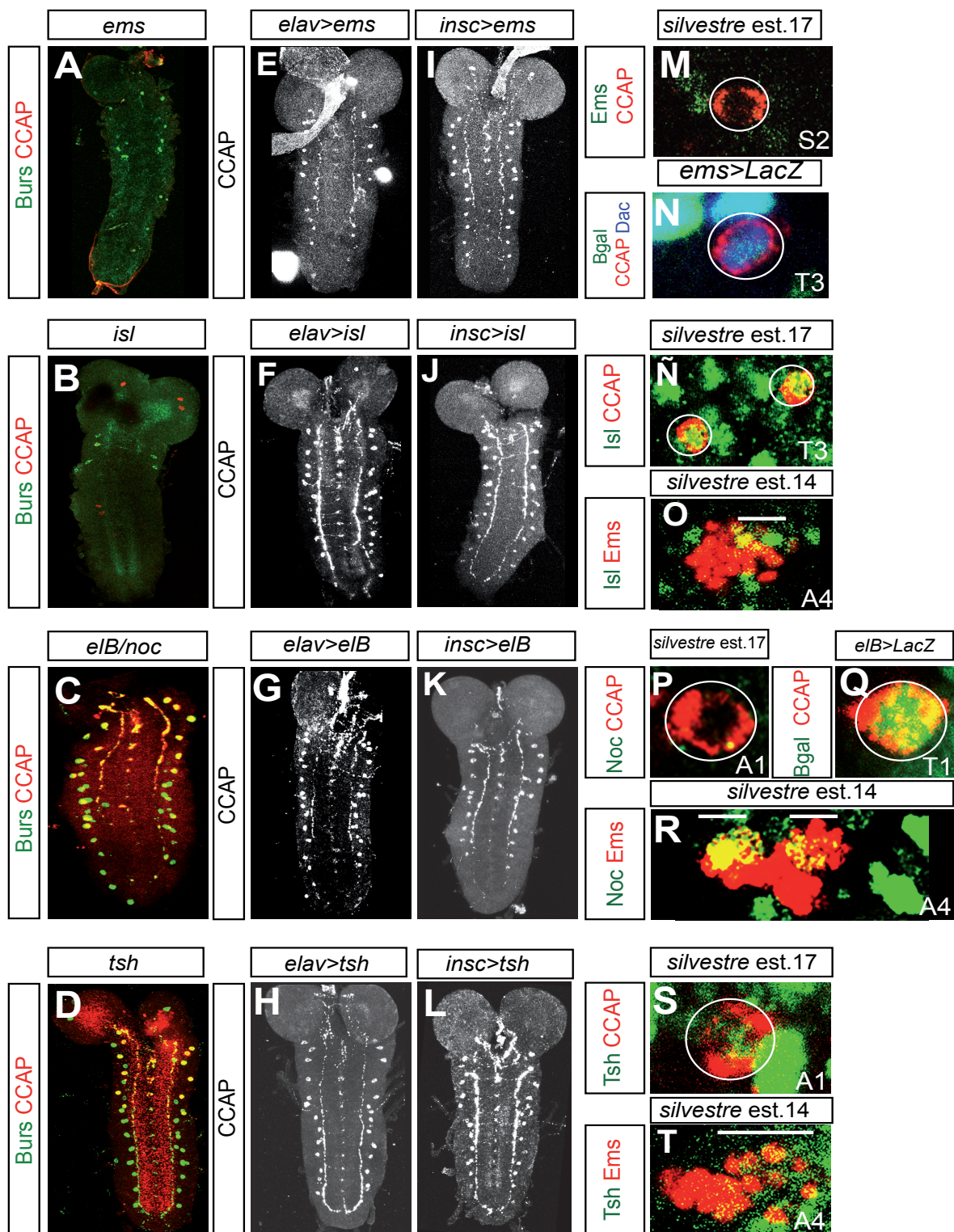
Como primera aproximación estudiamos una serie de factores de transcripción con una función conocida o que se expresen en el SNC de *Drosophila melanogaster*. Analizamos su posible implicación en la adquisición del destino CCAP/Bursicón teniendo embriones mutantes de estadio 17 con el anticuerpo  $\alpha$ -CCAP. De esta forma encontramos que la falta de función de los genes *empty spiracles (ems)*, *islet (isl)* y el complejo *elbow/no ocelli (elB/noc)* alteraban el número de neuronas CCAP/Bursicón presentes en la CNV. A continuación analizaremos con más detalle los fenotipos obtenidos. Otros genes cuya falta de función dio lugar a un fenotipo silvestre o suave están recogidos en la tabla 2.

### 7.2. Análisis de deficiencias genéticas

La segunda estrategia que seguimos para encontrar genes implicados en la especificación de las neuronas CCAP/Bursicón fue examinar su patrón de expresión en una colección de pequeñas deficiencias genéticas. Elegimos la colección de deficiencias Zinn la cual se compone por 233 líneas que cubren aproximadamente el 50% del genoma de *Drosophila melanogaster* y tienen la particularidad de no comprometer la viabilidad de los embriones portadores hasta estadio 16 (Wright et al., 2010). Teñimos embriones de estadio 17 homocigóticos para 51 líneas mutantes con el anticuerpo  $\alpha$ -CCAP y en 16 de ellas observamos una reducción significativa del número de neuronas CCAP/Bursicón (Tabla 3). Tratamos de identificar el gen o los genes causantes del fenotipo analizando deficiencias de menor tamaño o bien mutaciones puntuales en los genes candidatos incluidos dentro de la deficiencia de origen. En el caso de la deficiencia *Df(2L)Exel6049* identificamos el gen *teashirt (tsh)* como el gen responsable del fenotipo observado. El estudio de la función del gen *tsh* en la especificación de las estas neuronas lo detallaremos a más adelante.

### 7.3. Análisis de la función de los genes implicados en la especificación de las neuronas CCAP/Bursicón

A continuación se muestran los resultados obtenidos en el análisis de la función en la especificación de las neuronas CCAP/Bursicón de los 5 factores de transcripción previamente identificados. Estos datos están resumidos en la tabla 4.



**Fig.R.15. Búsqueda de genes implicados especificación de las neuronas CCAP/Bursicón**

(A, B, C y D) Expresión de Bursicón (verde) y CCAP (rojo) en el SNC de embriones de estadio 17 *ems<sup>1</sup>* (A), *isl<sup>1</sup>* (B), *elB<sup>3.3.1</sup> noc<sup>D64</sup>* (C), *tsh<sup>8</sup>* (D). Expresión de CCAP en el SNC de embriones de estadio 17 en los que se expresó ectópicamente con *elav-Gal4*, *UAS-ems<sup>15B</sup>* (E), *UAS-isl* (F), *UAS-elB<sup>EP2039</sup>* (G), *UAS-tsh* (H). *insc-Gal4* *UAS-tsh* (S). Expresión de CCAP en el SNC de embriones de estadio 17 en los que se expresó ectópicamente con *insc-Gal4*, *UAS-ems<sup>15B</sup>* (I), *UAS-isl* (J), *UAS-elB<sup>EP2039</sup>* (K), *UAS-tsh* (L). (M,Ñ,P,S) Expresión en un hemineurómero de embriones silvestres de estadio 17 de CCAP (rojo) y Ems (verde) (M), Isl (verde) (Ñ), Noc (verde) (P), Tsh (verde) (S). (O) Expresión de β-galactosidasa (verde), CCAP (rojo) y Dac (azul) en un hemineurómero de un embrión *ems-Gal4* *UAS-lacZ* de estadio 17 crecido a 29°C. (O,R,T) Expresión en un hemineurómero izquierdo de embriones silvestres de estadio 14 de Ems (rojo) y Isl (verde) (O), Noc (verde) (R), Tsh (verde) (T). (Q) Expresión de β-galactosidasa (verde) y CCAP (rojo) en un hemineurómero de un embrión *elB-Gal4* *UAS-lacZ* de estadio 17 crecido a 29°C. Se indica en la parte baja de la imagen el número del segmento que se muestra.



### 7.2.1. El gen *empty spiracles*

El gen *ems* fue identificado con un *gen gap* necesario para el desarrollo del cerebro (Walldorf y Gehring, 1992). Unos años después, se observó que también estaba implicado en la especificación de algunas neuronas de la CNV (Hartmann et al., 2001). Para determinar el papel de *ems* en la especificación de las neuronas CCAP/Bursicón teñimos embriones mutantes *ems<sup>l</sup>* de estadio 17 con los anticuerpos  $\alpha$ -CCAP,  $\alpha$ -Bursicón y  $\alpha$ -Dac. En estas condiciones no observamos ninguna neurona CCAP/Bursicón (Fig.R.15A y tabla 1).

Por otra parte, expresamos ectópicamente *ems* en neuronas (*elav-Gal4 UAS-ems*) y en NBs (*insc-Gal4 UAS-ems*). Embriones de ambos genotipos teñidos con el anticuerpo  $\alpha$ -CCAP presentaron un fenotipo silvestre (Fig.R.15E, I y tabla 1).

Por último, quisimos saber si Ems se expresaba en las neuronas CCAP/Bursicón. Embriones silvestres de estadio 17 teñidos con los anticuerpos  $\alpha$ -CCAP y  $\alpha$ -Ems no mostraron neuronas CCAP/Bursicón con expresión de Ems (Fig.R.15E). Por el contrario, al expresar el gen reportero de la  $\beta$ -galactosidasa bajo el control del promotor de *ems* (*ems-Gal4 UAS-LacZ*) y teñir estos embriones de estadio 17 con los anticuerpos  $\alpha$ -CCAP,  $\alpha$ - $\beta$ -galactosidasa, observamos colocalización de ambas proteínas (Fig.R.15M y fig.R.2D). Concluimos que la estabilidad de la  $\beta$ -galactosidasa nos estaba permitiendo detectar la expresión de Ems que se había producido en las neuronas CCAP/Bursicón en un estadio previo al 17.

### 7.2.2. El gen *islet*

Thor y Thomas. mostraron que el gen *islet*, también denominado *tailup*, forma parte de los códigos combinatoriales que dan identidad a dos grupos de motoneuronas de la CNV (Thor y Thomas, 1997). Para analizar el papel de *isl* en la especificación de las neuronas CCAP/Bursicón teñimos embriones de estadio 17 mutantes (*isl<sup>l</sup>*) con los anticuerpos  $\alpha$ -CCAP,  $\alpha$ -Bursicón y  $\alpha$ -Dac. Estos embriones no mostraron ninguna neurona CCAP/Bursicón (Fig.R.15B y tabla 1).

Paralelamente, expresamos ectópicamente *isl* en neuronas (*elav-Gal4 UAS-isl*) y en NBs (*ins-Gal4 UAS-isl*). En ambos casos, observamos fenotipos silvestres tras teñir embriones de estadio 17 con estas combinaciones genéticas con el anticuerpo  $\alpha$ -CCAP (Fig.R.15F, J y tabla 1).

Finalmente, estudiamos la expresión de Isl en las neuronas CCAP/Bursicón. En embriones silvestres de estadio 17 teñidos con los anticuerpos  $\alpha$ -CCAP y  $\alpha$ -Isl observamos expresión de Isl tanto en las CCAP-NEs como en las CCAP-INs (Fig.R.15M). Quisimos saber si este gen se expresaba en el linaje temprano del NB 3-5 y para ello teñimos embriones de distintos estadios con los anticuerpos  $\alpha$ -Ems y  $\alpha$ -Isl. En embriones tempranos, de estadio 8 a 11, observamos una tinción difusa. En embriones más tardíos, de estadio 14 en adelante, observamos un grupo de células Ems positivas

fuertemente marcadas por el anticuerpo de Isl. Estas células ocupaban la posición más alejada del NB dentro del grupo de células Ems positivas, por lo que inferimos que debían de ser las primeras células generadas por el NB 3-5 entre las cuales se encuentran las neuronas CCAP/Bursicón (Fig.R.15K).

### 7.2.3. El complejo *elbow/no ocelli*

Una mutación letal en el complejo *elB/noc* resultó ser la causante del fenotipo de pérdida de expresión de CCAP que encontramos en una línea a priori mutante para el gen *escargot*, un gen implicado en la división asimétrica de los NBs (Ashraf et al., 1999; Ashraf y Ip, 2001; Cai et al., 2001). *elB* y *noc* forman parte de un complejo génico y muestran el mismo patrón de expresión así como funciones redundantes en el desarrollo de los discos imaginales (Weihe et al., 2004). Con el fin de profundizar en el análisis del fenotipo causado por la falta de función del complejo *elB/noc* teñimos embriones de estadio 17 *elB<sup>3.3.1</sup> noc<sup>D64</sup>* con los anticuerpos  $\alpha$ -CCAP,  $\alpha$ -Bursicón y  $\alpha$ -Dac. Estos embriones mostraron un patrón silvestre de expresión de Bursicón a la vez que una pérdida total de la expresión de CCAP (Fig.R.15L y tabla 1). Este resultado sugiere que el complejo *elB/noc* está implicado la activación del neuropéptido CCAP y no en la viabilidad de las neuronas CCAP/Bursicón.

Por otra parte, expresamos ectópicamente *elB* en neuronas (*elav-Gal4 UAS-elB*) y en NBs (*insc-Gal4 UAS-elB*). Al igual que en los dos casos anteriores, observamos un fenotipo silvestre en embriones de estadio 17 de ambos genotipos teñidos con el anticuerpo  $\alpha$ -CCAP (Fig.R.15G, K y tabla 1).

Asimismo, analizamos el patrón de expresión del complejo EIB/Noc. En primer lugar teñimos embriones silvestres de estadio 17 con los anticuerpos  $\alpha$ -CCAP y  $\alpha$ -Noc pero no observamos coexpresión de ambas proteínas (Fig.R.15P). Sin embargo, al activar la expresión del gen reportero *GFP* con *elB-Gal4 (elB-Gal4 UAS-GFP)* y teñir estos embriones con los anticuerpos  $\alpha$ -CCAP y  $\alpha$ -GFP, pudimos observar en embriones de estadio 17, expresión de GFP en algunas neuronas CCAP/Bursicón (Fig.R.15Q). Este resultado pone de manifiesto la expresión de *elB* en las neuronas CCAP/Bursicón en un estadio anterior al 17.

Finalmente, estudiamos la expresión de estos genes en el linaje temprano del NB 3-5. Embriones de estadio 11 teñidos con los anticuerpos  $\alpha$ -Ems y  $\alpha$ -Noc presentaron una expresión difusa de Noc. Por el contrario, en embriones más tardíos, de estadio 14, la expresión de Noc apareció de forma más clara en dos grupos de células: unas cercanas al NB 3-5, por lo tanto generadas en último lugar y otras que ocupaban una zona intermedia dentro de las células marcadas con Ems (Fig.R.15R). Teniendo en cuenta su posición, es posible que las neuronas CCAP/Bursicón se encuentren dentro de este segundo grupo de células marcadas con Ems y Noc. No obstante, carecemos de herramientas que nos permitan identificarlas en ese estadio.

#### 7.2.4. El gen *teashirt*

Como se ha señalado anteriormente este gen se identificó en el análisis de un conjunto de deficiencias genéticas. Con el fin de conocer el papel de *tsh* en la especificación de las neuronas CCAP/Bursicón analizamos el fenotipo generado por una pequeña deficiencia, *Df(2R)tsh<sup>8</sup>*, que elimina *tsh* y parte de la región reguladora del gen *tiptop* (*tio*), ya que se ha descrito que *tsh* actúa de forma redundante junto al gen *tio* en algunas de sus funciones como es la represión de *wingless* (*wg*) en la epidermis ventral (Laugier et al., 2005). Teñimos embriones *tsh<sup>8</sup>* de estadio 17 con los anticuerpos  $\alpha$ -CCAP,  $\alpha$ -Bursicón y  $\alpha$ -Dac y constatamos que la tinción de Bursicón y Dac era silvestre mientras que la tinción de CCAP se perdía por completo (Fig.R.15D y tabla 1). Concluimos que *tsh*, al igual que el complejo *el/noc*, es necesario para la activación del neuropéptido CCAP, pero no para la viabilidad de las neuronas, ni para la expresión de Bursicón.

A continuación expresamos ectópicamente *tsh* en neuronas (*elav-Gal4 UAS-tsh*) y en NBs (*insc-Gal4 UAS-tsh*). En ambos casos encontramos un fenotipo silvestre al teñir embriones con estos genotipos de estadio 17 con el anticuerpo  $\alpha$ -CCAP (Fig.R.15H, L y tabla 1).

Comprobamos que Tsh se expresaba en las neuronas CCAP/Bursicón teñiendo embriones silvestres de estadio 17 con los anticuerpos  $\alpha$ -CCAP y  $\alpha$ -Tsh (Fig.R.15D). Por otra parte, analizamos su expresión en el linaje temprano del NB 3-5 teñiendo embriones de estadio 8 a 14 con los anticuerpos  $\alpha$ -Ems y  $\alpha$ -Tsh. En embriones de estadio 11 no observamos expresión de Tsh en ninguna célula del linaje del NB 3-5, sin embargo, en embriones más tardíos, de estadio 14, la mayor parte de neuronas marcadas con Ems expresaban Tsh (Fig.R.15T).





# Discusión

---



# 1. El linaje del NB 3-5 como sistema modelo

## 1.1. El estudio de la especificación neural requiere marcadores de identidad celular

Para estudiar los mecanismos de especificación neural se requieren marcadores que permitan identificar los diferentes destinos neurales existentes. En el SNC, cada hemisegmento está formado por un importante número de células con identidades únicas, contrariamente a lo que sucede en otros tejidos, donde las células con una misma identidad se agrupan formando territorios. Es necesario disponer de marcadores que permitan distinguir estos destinos individuales para que la interpretación de los fenotipos generados por los distintos genotipos mutantes sea resolutive.

En un intento por solventar esta carencia, distintos laboratorios están generando conjuntamente una colección de líneas de moscas transgénicas portadoras de las zonas reguladoras de todos los genes con expresión conocida en el SNC. Cada línea tiene integrado en su genoma un vector Gal4 que contiene una región de ADN genómico de no más de 3kb correspondiente a una putativa región reguladora. El objetivo final de este proyecto es producir una colección de líneas Gal4 con dominios de expresión restringidos y de esta forma poder manipular e identificar tipos celulares individuales o grupos funcionales en el SNC *Drosophila melanogaster* (Pfeiffer et al., 2008) (Jenett et al., 2012; Li et al., 2014; Manning et al., 2012).

Paralelamente, el grupo de C.Q.Doe ha desarrollado un programa informático capaz de integrar múltiples patrones de expresión, estudiar su relación, comparar con bases de datos existentes y realizar reconstrucciones en 3D. Además, este programa permite ser actualizado por el usuario (Heckscher et al., 2014). A modo de prueba, los autores han generado un atlas de SNC de embrión tardío basado en 8 factores de transcripción y 75 líneas Gal4. Siguiendo esta metodología han marcado el 60% de las interneuronas presentes de un hemisegmento.

## 1.2. Los marcadores celulares de linaje

Una estrategia complementaria para identificar destinos celulares en el SNC son los marcadores de linaje: genes que se expresan en uno o varios NBs así como en su progenie. Estos marcadores permiten visualizar el linaje de un NB diferenciándolo del resto de células del SNC.

En la CNV de *Drosophila melanogaster* se han identificado varios marcadores de linaje. Por una parte, el gen *gsb* se expresa en los NBs de la fila 5, 6 y dos NBs de la fila 7 (NB 7-1 y NB 7-3), así como en su progenie (Buenzow and Holmgren, 1995). Sin embargo, la proximidad de los NBs que expresan este gen impide que sus linajes sean identificados de manera individual. Para solventar este problema es posible utilizar un segundo marcador de forma que la combinación de ambos marcadores se produzca en un único NB. Siguiendo esta estrategia y utilizando la expresión conjunta de *gsb*

y de *acheate* con el sistema Split-Gal4 (Luan et al., 2006b), Kohwi *et al.* marcaron el linaje del NB 7-1 (Kohwi et al., 2013). Por otra parte, la expresión del gen *eg* en un número restringido de NBs ha permitido la descripción detallada de los linajes de los NBs 3-3 (Tsuji et al., 2008) y 7-3 (Karcavich and Doe, 2005). Por último, la expresión de *ladybird* (*ldb*) en el NB 5-6 ha sido clave para el análisis de todo su linaje (Baumgardt et al., 2009).

### 1.3. El linaje temprano del NB 3-5

A pesar de los avances realizados, solo se conoce los linajes completos de 3 de los 30 NBs que delaminan en un hemisegmento, el NB 3-3 (Tsuji et al., 2008), el NB 7-3 (Karcavich and Doe, 2005) y el NB 5-6 (Baumgardt et al., 2009). En este trabajo, gracias a la expresión de Ems hemos estudiamos la progenie del NB 3-5. Este NB delamina en el estadio 8 y genera el linaje esquematizado en la figR.5E.

Los linajes de los NB 3-5 y 5-6 (Baumgardt et al., 2009) presentan varias similitudes. Por una parte, ambos NBs se generan en la primera ola de delaminación y comienzan su programa de desarrollo por la ventana temporal Hb. Además, las dos primeras células originadas tanto por el NB 5-6 como por el NB 3-5 expresan Hb, Kr y Pdm. Pdm se expresa en el NE durante las primeras olas de delaminación por lo que la mayor parte de células generadas tempranamente en el SNC heredan su expresión (Dick et al., 1991; Kambadur et al., 1998). No obstante también existen diferencias entre los linajes de estos dos NBs. Un ejemplo es la duración de la ventana Hb: mientras que el NB 3-5 solo genera 2 CMGs Hb positivas, el NB 5-6 da lugar a 3 CMGs durante la primera ventana temporal. Este dato junto a los experimentos de trasplante y cultivo in vitro de NBs (Brody and Odenwald, 2000; Huff et al., 1989; Luer and Technau, 2009), ponen de manifiesto que la duración de las ventanas temporales se regula de forma autónoma en cada linaje.

El linaje del NB 3-5 presenta ciertas ventajas para su utilización como sistema modelo. El NB 3-5 delamina en el estadio 8 por lo que se puede identificar y manipular con relativa facilidad. Además, este NB genera un importante número de células (entre 25-30) (Schmid et al., 1999; Schmidt et al., 1997). Por lo tanto, su programa de desarrollo debe contener diversos mecanismos de especificación. Por último, la descripción del linaje temprano del NB 3-5 realizada en este trabajo permite relacionar dos destinos neuronales diferenciados (CCAP-NEs y CCAP-INs), identificables por la expresión de dos neuropéptidos, con los procesos de especificación que suceden tempranamente en el embrión.

Sin embargo, trabajar con el linaje del NB 3-5 como modelo conlleva ciertas limitaciones todavía no resueltas. Por un lado, las herramientas disponibles solo permiten identificar linaje del NB 3-5 hasta estadio 11, ya que como se ha señalado previamente, a partir de este estadio *ems* también se expresa en el NB3-3 y el NB4-4. Una manera de resolver esta cuestión es tratar de aislar la región reguladora que dirige la expresión de *ems* específicamente en el NB 3-5. Esta misma aproximación

se utilizó con éxito para restringir la expresión de *ldb* al NB 5-6 (De Graeve et al., 2004). Por otro lado, actualmente solo los genes temporales nos permiten caracterizar la progenie del NB 3-5 ya que salvo *ems*, ninguno de los genes identificados se expresan tempranamente en el linaje. Por lo tanto, un objetivo futuro es encontrar marcadores que nos permitan identificar las diferentes células del linaje en estadios tempranos del desarrollo.

## **2. Los genes homeóticos controlan espacial y temporalmente la diferenciación de las neuronas CCAP/Bursicón**

### **2.1. Las CCAP-INs se generan en todos los segmentos y no requieren de ningún gen homeótico para su especificación**

El patrón de expresión de las neuronas CCAP/Bursicón presenta variaciones a lo largo el eje antero-posterior. Mientras las CCAP-INs están presentes en todos los segmentos del CNV, desde el S1 al A7, las CCAP-NEs solo aparecen en los segmentos T3-A4 en larva de primer estadio y T3-A7 en pupa. En este trabajo mostramos que las CCAP-INs no se alteran ante la falta de función de ningún gen homeótico. Estas neuronas muestran también un patrón de expresión silvestre cuando eliminamos conjuntamente varios genes homeóticos o los expresamos ectópicamente. Concluimos por tanto que las CCAP-INs no requieren la expresión de ningún gen homeótico para su especificación.

La mayoría de los neuropéptidos presentan un patrón restringido en el eje antero-posterior. Ejemplos de ello son la expresión de Leucoquinina la cual se da en los segmentos A1-7, la expresión de FMRFamida en los segmentos T1-3, o la expresión de Capability en los segmentos A2-4 (revisado por (Nassel and Winther, 2010)). Existen sin embargo algunas excepciones como son el Neuropeptide-like precursor 1, presente en la mayoría de segmentos y el neuropéptido Proctolin expresado por unas 400 células de la CNV (Nassel and Winther, 2010). La presencia de las CCAP-INs en todos los segmentos del la CNV sugiere que estas células participan en circuitos neurales repetidos de manera segmental. Aunque se desconoce las células con las cuales realizan conexiones, se ha descrito que en larva de tercer estadio las CCAP-INs emiten dos proyecciones, una proyección longitudinal a lo largo de los fascículos mediales dorsales y ventrales que acaba uniéndose con el resto de proyecciones longitudinales en los segmentos A8/9; y una proyección medial que forma extensas arborizaciones en alrededor de la línea media, entre los fascículos mediales dorsales y ventrales (Vomel and Wegener, 2007). Además, se conoce que el receptor del CCAP es un receptor acoplado a la proteína G y codificado por el gen CG6111 (Cazzamali et al., 2003; Park et al., 2002). Sería interesante estudiar el patrón de expresión de este receptor y conocer cuáles son las células que requieren de su función.

En este trabajo y utilizando no encontramos diferencias entre las CCAP-INs de los distintos hemisegmentos. Teniendo en cuenta que utilizamos únicamente la expresión de CCAP y Bursicón para indentificar estas neuronas, es posible que si pudieramos analizar otras caracterísctas como la axonación o la expresión de otros marcadores, encontraríamos diferencias entre ellas. De hecho, se

han descrito singularidades para alguna de ellas en estadios más avandos del desarrollo. Luan *et al.* observaron que únicamente las CCAP-INs del segmento S3 mantienen la expresión de Bursicón en el estadio de pupa (Luan et al., 2006a) y producen terminales axónicas que se expanden por toda la CNV. Paralelamente, Kim *et al.* describieron que el péptido mioinhibitorio (MIP) se expresa exclusivamente en las CCAP-INs del T3 al A4 (Kim et al., 2006). Es probable que los genes *Scr* y *Ubx*, que se expresan en los segmentos S2-S3 y T2-A7 respectivamente realicen una función en la especificación de estos dos grupos de neuronas CCAP-INs que no hemos identificado en este estudio.

## 2.2. *Ubx* y *abd-A* evitan la apoptosis de las CCAP-NEs en los segmentos T3-A7

En este trabajo mostramos que la expresión de *Ubx* en la neurona es suficiente para evitar la apoptosis de las CCAP-NEs. Por una parte, su expresión ectópica provoca la aparición de CCAP-NEs en los segmentos anteriores, mientras que su falta de función conlleva la pérdida de las CCAP-NEs de los segmentos T3 y A1. Asimismo, dobles mutantes para *Ubx* y *abd-A* no presentan ninguna CCAP-NEs por lo que concluimos que la falta de función de *Ubx* es rescatada por la expresión *abd-A* en los segmentos A2-A4. Este mismo modelo de redundancia tiene lugar en la especificación de las neuronas ABLKs (Estacio-Gomez et al., 2013). Nuestros resultados indican que *Ubx* y *abd-A* también aseguran la supervivencia de las CCAP-ENs de los segmentos A5-A7 dado que en mutantes para *Ubx*, *abd-A* y *Abd-B* no observamos ninguna CCAP-ENs en la CNV. Además *Ubx* se expresa tanto en el linaje temprano como en el NB 3-5 de los segmentos T3-A7 y en mutantes *Ubx*, *Abd-B* en los que la expresión de *abd-A* no está afectada pudimos indentificar CCAP-ENs en los segmentos A2-A7. En larva de tercer estadio no observamos expresión de *Ubx* en la CCAP-ENs del segmento T3. Este dato sugiere que *Ubx* y *abd-A* realizan su función anti-apoptótica en un momento concreto del desarrollo y que no se requiere su expresión de forma constante para la activación de los neuropéptidos CCAP y Bursicón. Contrariamente a las neuronas CCAP/Bursicón, se ha descrito que en las neuronas ABLKs, la expresión de *Ubx* y *abd-A* debe mantenerse para asegurar la expresión de Leucoquinina (Estacio-Gomez, 2013).

Resulta sorprendente que la expresión ectópica de *Abd-A* impida la especificación de las neuronas CCAP/Bursicón. Es posibles que los niveles de expresión de *Abd-A* ectópicos, mucho más altos que endógenos, interfieran en la especificación de estas neuronas. Otra alternativa es que la expresión de *Abd-A* se requiera en un momento preciso del desarrollo y que la expresión permanente en la neurona comprometa su especificación. Se ha demostrado que la expresión de los genes homeóticos genera distintos efectos dependiendo del momento en el que se produzca. Los NBs abdominales postembrionarios, entre los que se encuentra el NB 5-5 (Estacio-Gomez et al., 2013), mueren por apoptosis tras un pulso de expresión de *Abd-A* (Bello et al., 2003). Sin embargo, la expresión ectópica de *Abd-A* durante la embriogénesis evita la entrada en quiescencia del NB 5-5 (Estacio-Gomez et al. 2013). Otro ejemplo son las neuronas GW del NB 7-3. En una situación silvestre, un pulso de expresión tardío de *Ubx* provoca su muerte por apoptosis mientras que, un pulso temprano de ex-

presión ectópica de Ubx no tiene ningún efecto en su especificación (Rogulja-Ortmann et al., 2008). Cabe señalar que el papel que juega Ubx en la especificación de las motoneuronas GW regulando la apoptosis es contrario al que realiza en las neuronas CCAP/Bursicón. Sería por tanto interesante estudiar si los genes homeóticos contralan directa o indirectamente la activación de los genes proapoptóticos, así como qué factores están modulando de la respuesta de estos últimos.

### **2.3. *Abd-B* controla la diferenciación terminal de las CCAP-NEs de los segmentos A5-A7**

El patrón de las neuronas CCAP/Bursicón presentan variaciones tanto espaciales como temporales. Las CCAP-NEs de los segmentos A5-7 se generan durante la neurogénesis embrionaria (Veverysa and Allan, 2012) pero no expresan ni CCAP ni Bursicón hasta el estadio de larva tardía. Se considera que una neurona está completamente diferenciada cuando expresa todos los genes necesarios para su función, de forma que las CCAP-NEs tardías no terminan de diferenciarse hasta el estadio de larva. Esto mismo sucede con las neuronas denominadas Tv2 y Tv3. Todas las neuronas Tv se generan durante el desarrollo embrionario, pero mientras la Tv1 y la Tv4 expresan los péptidos Nplp1 y FMRFa respectivamente al final de la embriogénesis (Baumgardt et al., 2007), las neuronas Tv2 y la Tv3 comienzan a expresar FMRFa en la metamorfosis (Schneider et al., 1993).

Durante su desarrollo, *Drosophila melanogaster* pasa por distintas fases, una fase embrionaria, tres fases larvarias, una fase pupal y una fase adulta. El paso de una a otra conlleva la pérdida de la cutícula de la fase anterior y la formación de una nueva. Para que este proceso, denominado ecdisis, se lleve a cabo con éxito se requiere una precisa concatenación de patrones de comportamientos y cambios fisiológicos (White and Ewer, 2014). Asimismo la ecdisis pupal está acompañada por una remodelación de las redes neuronales que permite cubrir las necesidades cambiantes del organismo (Levine et al., 1995). Se produce por ejemplo, la muerte de las neuronas RP2 de los segmentos A2-A7 (Winbush and Weeks, 2011), la restructuración de las conexiones axonales de un importante número de neuronas (Brown and Truman, 2009) y la activación de los neuropéptidos previamente descritos.

En este trabajo, mostramos que *Abd-B* es responsable del control temporal de la diferenciación terminal de las CCAP-ENs tardías mediante la represión de la expresión de los neuropéptidos CCAP y Bursicón dado que su falta de función permite la diferenciación temprana de estas neuronas. Además su expresión ectópica, tanto temprana como tardía, provoca la pérdida de CCAP y de Bursicón en toda la CNV. Esto sugiere que *Abd-B* juega un papel temporal en el control la diferenciación terminal de estas neuronas. Por otra parte, nuestros datos sugieren que *Abd-B* puede controlar la expresión de CCAP y Bursicón uniéndose directamente a sus regiones reguladoras.

Aunque se desconoce la función del retraso en la diferenciación de las neuronas CCAP-NEs tardías, varios resultados ponen de manifiesto que estas neuronas poseen características funcionales

que las diferencian del resto de CCAP-NEs. Por una parte, se ha demostrado que las CCAP-NEs tardías son suficientes para llevar a cabo la ecdisis pupal, pero no lo son para el inflado de las alas después de la eclosión del adulto (Veverlytsa and Allan, 2012). Además, se ha observado que, contrariamente al resto de neuronas CCAP/Bursicón, no se activan como respuesta a la expresión de la ETH (Ecdysis-triggering hormone) (Kim et al., 2006), la hormona que inicia la ecdisis y se expresa en las células Inka (Yamanaka et al., 2013). Por último, las CCAP-NEs tardías son las únicas neuronas CCAP/Bursicón que requieren el receptor de ecdisona para la expresión de CCAP. Abd-B debe de ser el responsable último de estas diferencias. Es posible por tanto, que el retraso en la diferenciación de las CCAP-NEs tardías sea una consecuencia de la expresión Abd-B, necesaria para asegurar las características previamente descritas. Otra posibilidad es que para que las ecdisis larvarias se produzcan correctamente se requiera que las CCAP-NEs de los segmentos A5-7 no expresen ningún neuropéptido.

El papel de los genes homeóticos ha sido principalmente estudiado en la definición de patrones espaciales a lo largo del eje antero-posterior, sin embargo, los resultados aquí mostrados dan cuenta de la complejidad de la función de estos genes en el desarrollo del SNC.

### 3. La función de *hb* en la especificación neural

En los linajes de los distintos NBs, encontramos numeros casos en los que se generan más de una CMG durante una misma ventana temporal. Los ejemplos mejor estudiados corresponden a la ventana Cas. Durante esta ventana temporal, tanto el NB 3-3 como el NB 5-6 se dividen hasta 7 veces (Baumgardt et al., 2009; Tsuji et al., 2008). Existen también ejemplos correspondientes a la ventana Hb como son los NBs 7-1 y 3-1 los cuales generan dos CMGs Hb positivas cada uno (Isshiki et al., 1997) (Pearson and Doe, 2003; Tran and Doe, 2008) o el NB 5-6 que da lugar tres CMGs Hb positivas (Baumgardt et al., 2009). Estas observaciones nos llevan a preguntarnos cómo diferentes CMGs procedentes de una misma ventana temporal y de un mismo NB generan diferentes tipos neuronales.

#### 3.1. Distintos niveles de expresión de *hb* en el NB permiten la generación de diferentes tipos neuronales

A lo largo de este trabajo establecemos: que los niveles de expresión de Hb en el NB 3-5 aumentan a lo largo de su ventana, que las CCAP-NEs se generan en un momento anterior a las CCAP-INs y que ambos tipos neuronales requieren la inactividad de la ruta de Notch para su correcta especificación. Basándonos en estos resultados proponemos que la ventana Hb del NB 3-5 se divide en dos fases: durante la primera el NB expresa bajos niveles de Hb y da lugar a dos células, siendo una de ellas la CCAP-NE; durante la segunda fase, el NB expresa altos niveles de Hb y genera otras dos células entre las que se encuentra la CCAP-IN. Además demostramos que niveles bajos de expresión de Hb da lugar a CCAP-NEs ectópicas, mientras que altos niveles de expresión de este gen genera más CCAP-INs. Concluimos que los distintos niveles de expresión de Hb en el NB 3-5 otorgan una identidad



diferente a las dos CMGs que se originan a lo largo de esta ventana temporal.

Un mecanismo similar ha sido propuesto para el NB 7-1 (Pearson and Doe, 2003). En este caso Pearson *et al.* proponen que los niveles de expresión de Hb disminuyen en función del tiempo, diferenciando así la primera CMG de la segunda. Sin embargo, los autores no miden los niveles de expresión de Hb y observan que la expresión ectópica de bajos niveles de Hb provoca duplicaciones de los destinos generados tanto por la primera como por la segunda CMG. Se requiere por tanto un mayor análisis de este linaje para confirmar el modelo planteado.

Otro ejemplo descrito en la literatura la subdivisión de la ventana temporal Cas del NB 5-6. Esta subdivisión se lleva a cabo mediante dos bucles de retroalimentación positiva. En un primer momento, Cas activa la expresión de *collier* y de *squeeze (sqz)* lo que permite la especificación de la neurona Apterous 1 (Ap1). Posteriormente, Cas y Sqz activan la expresión de Nab, quien junto a Sqz reprime a Collier. En este contexto se producen las neuronas Apterous 2 (Ap2) y Apterous 3 (Ap3). Paralelamente, Grh se expresa en todas las neuronas Apterous en forma de gradiente, con menores niveles de la Ap1 y mayores en la Ap4. La falta de función de Grh provoca la pérdida de la neurona Ap4 mientras que su expresión ectópica genera más neuronas Ap4 (Baumgardt et al., 2009). Al igual que sucede con Hb en el NB 3-5, parece que distintos niveles de expresión de Grh en el NB 5-6 son los responsables de dar lugar a diferentes destinos neurales.

En conjunto, estos datos sugieren que durante la neurogénesis embrionaria, la expresión graduada de los *hb* y *grh* en los NBs juegan un importante papel de la especificación de distintos destinos dentro de una misma ventana temporal.

### 3.2. La función de *hb* en las neuronas

En este trabajo observamos que en las CCAP-INs los niveles de expresión de Hb son altos mientras que en las CCAP-NEs son bajos o indetectables. Asimismo, mostramos que la expresión ectópica de Hb en las neuronas es suficiente para transformar el destino CCAP-NE en CCAP-IN. De estos resultados concluimos que Hb tiene la capacidad de regular la batería de genes que dan lugar a la identidad CCAP-IN.

Pearson *et al.* observaron que la expresión ectópica de Hb en las neuronas del NB 7-1 no altera su fenotipo silvestre lo que les llevo a proponer que las neuronas no tienen capacidad para responder a la expresión de un gen temporal (Pearson et al., 2003). No obstante, más recientemente se ha observado que la expresión ectópica de Grh en las neuronas Ap es capaz de convertir los destinos Ap1, Ap2 y Ap3, en Ap4 (Baumgardt et al., 2009). Estas neuronas se generan de forma secuencial a a partir del NB5-6 y muestran un incremento progresivo de expresión de Grh. Del mismo modo que la expresión ectópica de Hb en las neuronas del linaje del NB 3-5 solo modifica el destino de las CCAP-INs; la expresión ectópica de Grh altera únicamente la identidad de las neuronas del mismo

linaje que ya expresaban Grh. Estos resultados sugieren que las neuronas mantienen la competencia que les permiten responder a la modificación de los niveles de expresión del gen que define la ventana temporal en la que se generaron.

En resumen, proponemos que los genes temporales realizan una función de especificación tanto en los NBs como en las neuronas. Queda ahora por entender si la función que realizan en las neuronas es necesaria y diferente de la que llevan a cabo en los NBs.

### 3.3. *ikaros*, el homólogo de *hb* en vertebrados

Se ha demostrado que un ortólogo de Hb en vertebrados, el gen *ikaros*, realiza una función similar al papel de Hb como gen temporal. Ikaros es un factor de transcripción con dos dominios de dedos de zinc relacionados estructuralmente con Hb.

En la retina de ratón, *ikaros* se expresa en las células progenitoras tempranas pero no en las tardías. Ratones mutantes para *ikaros* presentan una reducción de los destinos tempranos mientras que los tardíos no se ven afectados. Además, su expresión ectópica en células progenitoras tardías es suficiente para la generación de destinos tempranos (Elliott et al., 2008). Al igual que Hb, se ha observado que la expresión de este gen es permisiva y no instructiva ya que durante la ventana de Ikaros se generan al menos 3 tipos celulares diferentes. Debe existir por tanto un mecanismo que subdivida esta ventana temporal del mismo modo que sucede en *Drosophila melanogaster*. La expresión ectópica de *ikaros* también genera 3 destinos diferentes, por lo que es probable que no sean los distintos niveles de expresión los que aseguren la correcta especificación de los distintos.

Recientemente se ha demostrado que en la corteza cerebral de ratón, *ikaros* se expresa preferencialmente en los progenitores corticales tempranos (Alsio et al., 2013). La expresión sostenida de *ikaros* prolonga el periodo de generación de neuronas de capas profundas, neuronas tempranas, a expensas de las capas más superficiales. Los autores observan un aumento del número de células de las capas 5 y 6, lo que sugiere que al igual que en el caso anterior, la expresión ectópica de *ikaros* da lugar a varios tipos celulares. Cabe la posibilidad de que un mismo progenitor de lugar a células de las distintas capas, sin embargo, no se puede descartar que los de tipos celulares identificados procedan de distintos progenitores.

Estos dos trabajos ponen de manifiesto que *ikaros* se comporta como gen temporal temprano en la neurogénesis de vertebrados. Sin embargo, no se ha estudiado cómo se generan distintos destinos durante su ventana de expresión. La información obtenida en *Drosophila melanogaster* puede ser de gran utilidad a la hora de abordar esta pregunta-

## 4. Nuevos genes implicados en la especificación de las neuronas CCAP/Bursicón: *ems*, *isl*, *elB*, *noc*, *tsh*

Los NBs adquieren una identidad en función de su localización antes de delaminar. Esta identidad se traduce en la activación y/o represión secuencial de un conjunto de genes que contribuyen a la especificación de distintos destinos, entre los que se encuentran los genes temporales. De esta forma, una vez activados sus programas desarrollo, los NBs se comportan de manera autónoma celular. La ruta de Notch añade un nivel más de complejidad influyendo sobre la activación y/o represión de una batería de genes. No se conoce aún como la información recibida por este conjunto de genes : columnares, segmentales, homeóticos, temporales y diana de la ruta de Notch, se integra en una única célula para activar un programa de desarrollo y generar un destino específico. En este trabajo hemos estudiado cómo los mecanismos de especificación neuronal descritos en la literatura afectan a la adquisición del destino CCAP/Bursicón. De este modo hemos determinado que las neuronas CCAP/Bursicón proceden del NB 3-5, se generan durante la ventana Hb y requieren que la ruta de Notch esté inhibida para su correcta especificación. El siguiente objetivo es entender cómo estas informaciones se integran para dar lugar al destino neuronal diferenciado.

Teniendo en cuenta que estudiar el programa de desarrollo de un NB pasa por identificar los genes que lo componen, realizamos una búsqueda de genes cuya falta de función comprometiera la diferenciación de las neuronas CCAP/Bursicón. Identificamos así 5 factores de transcripción necesarios para la diferenciación de estas neuronas: *ems*, *isl*, *elB*, *noc* y *tsh*.

### 4.1. Función de los nuevos genes identificados en la adquisición del destino CCAP/Bursicón

#### 4.1.1. El gen *empty spiracles*

El gen *ems* codifica una proteína con homeodominio implicada en la regionalización del cerebro de *Drosophila melanogaster*. Su falta de función provoca la pérdida prácticamente total del deuto y tritocerebro, por lo que se le considera un gen gap anterior (Hartmann et al., 2000; Hirth et al., 1995; Walldorf and Gehring, 1992; Younossi-Hartenstein et al., 1997). En la CNV se expresa en los NB 3-3, 3-5 y 4-4 así como en la región del NE del que delaminan (Hartmann et al., 2000). Por una parte, se ha descrito que la falta de función de *ems* no afecta ni a la delaminación ni a la división de los NBs Ems positivos, pero sí a la axonación de las células a las que dan lugar (Hartmann et al., 2000). Por otra parte, se ha observado que la falta de función de *ems* en un linaje postembrionario del cerebro provoca la apoptosis de aproximadamente la mitad de su progenie (Lichtneckert et al., 2007). Teniendo en cuenta estos datos, cabe pensar que la pérdida de tinción de CCAP y de Bursicón que observamos en embriones mutantes para *ems* se deba a la apoptosis de estas células causada por su incorrecta axonación. Queda por comprobar si la supresión de la apoptosis rescata el fenotipo de pérdida de CCAP y Bursicón que observamos en mutantes *ems*.

#### 4.1.2. El gen *islet*

El gen *isl* codifica un factor LIM-HD necesario para la activación del neuropéptido en un conjunto de motoneuronas, así como para su correcta axonación (Thor y Thomas, 1997). En nuestro trabajo observamos que *isl* se expresa tanto en las CCAP-INs como en las CCAP-NEs. Al igual que *ems*, es posible que la expresión de *isl* sea necesaria para que estas neuronas emitan correctamente sus axones y aseguren su viabilidad. Para comprobar esta hipótesis necesitamos herramientas que nos permitan visualizar la axonación de las neuronas CCAP/Bursicón en ausencia de la activación los neuropéptidos.

#### 4.1.3. El complejo *elbow/no ocelli*

El complejo *elB/noc* abarca una región de unas 200 kb que codifica dos proteínas con dedos de zinc pertenecientes a la familia NET. Ambas están implicadas en el establecimiento del eje próximo-distal en las patas y alas (Weihe et al., 2004), así como en la morfogénesis de las ramas traqueales (Dorfman et al., 2002). En el desarrollo del sistema nervioso de *Drosophila melanogaster* tan solo se ha estudiado su función en la especificación de un subtipo de fotoreceptor (Dorfman et al., 2002). En vertebrados se sabe que las proteínas de la familia NET juegan un papel importante en la especificación de unas motoneuronas de la cuerda nerviosa del pollo (Ji et al., 2009) y en el desarrollo del romboencéfalo del pez zebra (Hoyle et al., 2004). En el caso de las neuronas CCAP/Bursicón, la falta de función del complejo *elB/noc* afecta tanto a las CCAP-INs como a las CCAP-NEs, aunque solo elimina la expresión de CCAP sin afectar la de Bursicón. Es posible que la expresión del complejo *elB/noc* se requiera para la activación del CCAP por lo que sería interesante saber si este complejo de factores de transcripción se une directamente a su región reguladora.

#### 4.2.3. El gen *teashirt*

El gen *tsh* codifica factor de transcripción con dedos de zinc implicado en diversos procesos a lo largo del desarrollo de la mosca. Colabora con los genes homeóticos del tronco para reprimir la expresión de los genes homeóticos de la cabeza (Fasano et al., 1991; Roder et al., 1992). Al igual que el complejo *elB/noc*, su falta de función altera la expresión de CCAP pero no la de Bursicón. De igual modo es posible que *tsh* se una directamente a la región reguladora del CCAP.

### 4.2. Integración de la función de *ems*, *isl*, *elB/noc* y *tsh* con los mecanismos de especificación previamente analizados

Nuestros resultados sugieren que los genes *ems*, *isl*, *elB*, *noc* y *tsh* están implicados en aspectos concretos de la diferenciación de las neuronas CCAP/Bursicón como son la axonación o la activación de uno de los neuropéptidos. De ser así, estos genes podrían ser considerados como efectores del programa de diferenciación establecido en el NB por los genes de segmentales, columnares y temporales.

Queda ahora comprender cómo estos últimos regulan su expresión. Una primera aproximación podría consistir en analizar cómo afecta la falta de función o la expresión ectópica de Hb a la expresión de *isl*, *el*, *noc* y *tsh*. Dado que la regulación de estos genes debe ser específica de cada linaje, es preciso estudiarla en la progenie del NB 3-5. Sin embargo, el linaje del NB 3-5 solo puede ser identificado hasta estadio 11 mientras que la expresión de *tup*, *noc* y *tsh* comienza alrededor del estadio 14. Para llevar a cabo este análisis debemos por tanto identificar previamente un marcador exclusivo del NB 3-5.

*ems* se expresa en el NE antes de la delaminación del NB 3-5 así como en el linaje de este. Por lo tanto no es esperable que su expresión esté regulada por un gen temporal. No obstante, sería interesante estudiar cómo los genes segmentales y columnares delimitan su patrón de expresión neuroectodérmico. Además, dado que *ems* se expresa tempranamente en el linaje del NB 3-5, es posible que sea necesario para la activación del resto de genes implicados en la especificación de las neuronas CCAP/Bursicón como son: *isl*, *el*, *noc*, *tsh* y *hb* por lo que otro objetivo sería analizar las relaciones genéticas entre ellos.

Por último, cabe señalar que ni *ems*, ni *isl*, ni *el* ni *tsh* generan neuronas CCAP/Bursicón fuera de su patrón silvestre al ser expresados ectópicamente. Estos genes requieren un contexto génico concreto para llevar a cabo su función, lo que sugiere que son parte de un código combinatorial. Es posible que la expresión ectópica conjunta de alguno de estos genes, o junto con la de *hb* si produzca neuronas CCAP/Bursicón ectópicas. En ese caso podríamos identificar las características de las células transformadas con el fin de encontrar nuevos genes implicados en la especificación de las neuronas CCAP/Bursicón.



# Conclusiones

---





1. En la larva de primer estadio se identifican dos tipos de neuronas CCAP/Bursicón. Una CCAP-IN presente en todos hemisegmentos, desde el hemisegmento S1 hasta el hemisegmento A7, y una CCAP-NE presente desde el hemisegmento T3 hasta hemisegmento A4. En la larva de tercer estadio, se observan además CCAP-NEs en los hemisegmentos A5 a A7.
2. El NB3-5 es el progenitor de todas las neuronas CCAP/Bursicón, delamina en el estadio 8 y comienza su programa de desarrollo en la ventana temporal Hb. Durante esta ventana temporal el NB3-5 se divide dos veces dando lugar a 4 células. En estadio 10, el NB entra en la ventana temporal Kr.
3. Los niveles crecientes de expresión de *hb* en el NB3-5 subdividen su ventana temporal. De esta forma altos niveles de expresión de *hb* en el NB dan lugar a la CCAP-NE mientras que bajos niveles de expresión permiten la generación de la CCAP-IN.
4. Las neuronas son competentes para responder a la expresión de los genes temporales ya que la expresión de altos niveles de Hb es suficiente para transformar la CCAP-NE en CCAP-IN.
5. La presencia de la neurona CCAP-EN en los diferentes segmentos está regulada por los genes del complejo Bithorax. Así la expresión de *Ubx* asegura la especificación de las CCAP-ENs en los segmentos T3 y A4 evitando su muerte por apoptosis. Esta función puede ser suplida por *abd-A* en los segmentos A2-A4.
6. El gen *Abd-B* controla temporalmente la expresión de los neuropéptidos CCAP y Bursicón en las CCAP-NEs de los segmentos A5-A7, reprimiendo su expresión durante el desarrollo larvario y permitiéndola al final de este.
7. La ruta de Notch debe estar inactiva para que las neuronas CCAP/Bursicón se especifiquen correctamente.
8. Los genes *ems*, *isl*, *el*, *noc* y *tsh* están implicados en la especificación de las neuronas CCAP/Bursicón. La falta de función de *ems* y de *isl* da lugar a la pérdida de expresión de CCAP y Bursicón, mientras que la falta del complejo *el/noc* y de *tsh* provoca la pérdida de expresión únicamente del neuropéptido CCAP.



# Bibliografía

---



**A**lsio, J.M., Tarchini, B., Cayouette, M., Livesey, F.J., 2013. Ikaros promotes early-born neuronal fates in the cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, E716-725.

Arendt, D., Nubler-Jung, K., 1999. Comparison of early nerve cord development in insects and vertebrates. *Development (Cambridge, England)* 126, 2309-2325.

Ashraf, S.I., Hu, X., Roote, J., Ip, Y.T., 1999. The mesoderm determinant snail collaborates with related zinc-finger proteins to control *Drosophila* neurogenesis. *The EMBO journal* 18, 6426-6438.

Ashraf, S.I., Ip, Y.T., 2001. The Snail protein family regulates neuroblast expression of *inscuteable* and *string*, genes involved in asymmetry and cell division in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)* 128, 4757-4767.

Azevedo, F.A., Carvalho, L.R., Grinberg, L.T., Farfel, J.M., Ferretti, R.E., Leite, R.E., Jacob Filho, W., Lent, R., Herculano-Houzel, S., 2009. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *The Journal of comparative neurology* 513, 532-541.

**B**abaoglan, A.B., O'Connor-Giles, K.M., Mistry, H., Schickedanz, A., Wilson, B.A., Skeath, J.B., 2009. Sanpodo: a context-dependent activator and inhibitor of Notch signaling during asymmetric divisions. *Development (Cambridge, England)* 136, 4089-4098.

Bassett, E.A., Wallace, V.A., 2012. Cell fate determination in the vertebrate retina. *Trends in neurosciences* 35, 565-573.

Baumgardt, M., Karlsson, D., Salmani, Behzad Y., Bivik, C., MacDonald, Ryan B., Gunnar, E., Thor, S., 2014. Global Programmed Switch in Neural Daughter Cell Proliferation Mode Triggered by a Temporal Gene Cascade. *Developmental cell* 30, 192-208.

Baumgardt, M., Karlsson, D., Terriente, J., Diaz-Benjumea, F.J., Thor, S., 2009. Neuronal subtype specification within a lineage by opposing temporal feed-forward loops. *Cell* 139, 969-982.

Baumgardt, M., Miguel-Aliaga, I., Karlsson, D., Ekman, H., Thor, S., 2007. Specification of neuronal identities by feedforward combinatorial coding. *PLoS biology* 5, e37.

Beachy, P.A., Helfand, S.L., Hogness, D.S., 1985. Segmental distribution of bithorax complex proteins during *Drosophila* development. *Nature* 313, 545-551.

Bello, B.C., Hirth, F., Gould, A.P., 2003. A pulse of the *Drosophila* Hox protein Abdominal-A schedules the end of neural proliferation via neuroblast apoptosis. *Neuron* 37, 209-219.

Bender, W., 2008. MicroRNAs in the *Drosophila* bithorax complex. *Genes & development* 22, 14-19.

Benito-Sipos, J., Estacio-Gomez, A., Moris-Sanz, M., Baumgardt, M., Thor, S., Diaz-Benjumea, F.J., 2010. A genetic cascade involving *klumpfuss*, *nab* and *castor* specifies the abdo-

- minal leucokinergeric neurons in the *Drosophila* CNS. *Development* (Cambridge, England) 137, 3327-3336.
- Benito-Sipos, J., Ulvklo, C., Gabilondo, H., Baumgardt, M., Angel, A., Torroja, L., Thor, S., 2011. Seven up acts as a temporal factor during two different stages of neuroblast 5-6 development. *Development* (Cambridge, England) 138, 5311-5320.
- Berger, C., Pallavi, S.K., Prasad, M., Shashidhara, L.S., Technau, G.M., 2005. Cyclin E acts under the control of Hox-genes as a cell fate determinant in the developing central nervous system. *Cell cycle* (Georgetown, Tex.) 4, 422-425.
- Berger, C., Renner, S., Luer, K., Technau, G.M., 2007. The commonly used marker ELAV is transiently expressed in neuroblasts and glial cells in the *Drosophila* embryonic CNS. *Dev Dyn* 236, 3562-3568.
- Berger, C., Urban, J., Technau, G.M., 2001. Stage-specific inductive signals in the *Drosophila* neuroectoderm control the temporal sequence of neuroblast specification. *Development* (Cambridge, England) 128, 3243-3251.
- Bhat, K.M., 1999. Segment polarity genes in neuroblast formation and identity specification during *Drosophila* neurogenesis. *Bioessays* 21, 472-485.
- Bier, E., Vaessin, H., Younger-Shepherd, S., Jan, L.Y., Jan, Y.N., 1992. *deadpan*, an essential pan-neural gene in *Drosophila*, encodes a helix-loop-helix protein similar to the hairy gene product. *Genes & development* 6, 2137-2151.
- Birkholz, O., Vef, O., Rogulja-Ortmann, A., Berger, C., Technau, G.M., 2013. Abdominal-B and caudal inhibit the formation of specific neuroblasts in the *Drosophila* tail region. *Development* (Cambridge, England) 140, 3552-3564.
- Bossing, T., Udolph, G., Doe, C.Q., Technau, G.M., 1996. The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm. *Developmental biology* 179, 41-64.
- Brand, A.H., Perrimon, N., 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* (Cambridge, England) 118, 401-415.
- Brody, T., Odenwald, W.F., 2000. Programmed transformations in neuroblast gene expression during *Drosophila* CNS lineage development. *Developmental biology* 226, 34-44.
- Broihier, H.T., Kuzin, A., Zhu, Y., Odenwald, W., Skeath, J.B., 2004. *Drosophila* homeodomain protein Nkx6 coordinates motoneuron subtype identity and axonogenesis. *Development* (Cambridge, England) 131, 5233-5242.
- Brown, H.L., Truman, J.W., 2009. Fine-tuning of secondary arbor development: the effects of the ecdysone receptor on the adult neuronal lineages of the *Drosophila* thoracic CNS. *Development* (Cambridge, England) 136, 3247-3256.
- Buenzow, D.E., Holmgren, R., 1995. Expression of the *Drosophila* gooseberry locus defines

a subset of neuroblast lineages in the central nervous system. *Developmental biology* 170, 338-349.

**C**ai, Y., Chia, W., Yang, X., 2001. A family of snail-related zinc finger proteins regulates two distinct and parallel mechanisms that mediate *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions. *The EMBO journal* 20, 1704-1714.

Campos-Ortega, J.A., Hartenstein, V., 1985. The Embryonic development of *Drosophila melanogaster*.

Carroll, S.B., 1995. Homeotic genes and the evolution of arthropods and chordates. *Nature* 376, 479-485.

Carroll, S.B., DiNardo, S., O'Farrell, P.H., White, R.A., Scott, M.P., 1988. Temporal and spatial relationships between segmentation and homeotic gene expression in *Drosophila* embryos: distributions of the fushi tarazu, engrailed, Sex combs reduced, Antennapedia, and Ultrabithorax proteins. *Genes & development* 2, 350-360.

Casares, F., Mann, R.S., 2001. The ground state of the ventral appendage in *Drosophila*. *Science* (New York, N.Y) 293, 1477-1480.

Castelli-Gair, J., Greig, S., Micklem, G., Akam, M., 1994. Dissecting the temporal requirements for homeotic gene function. *Development* (Cambridge, England) 120, 1983-1995.

Cazzamali, G., Hauser, F., Kobberup, S., Williamson, M., Grimmelikhuijzen, C.J., 2003. Molecular identification of a *Drosophila* G

protein-coupled receptor specific for crustacean cardioactive peptide. *Biochemical and biophysical research communications* 303, 146-152.

Celniker, S.E., Keelan, D.J., Lewis, E.B., 1989. The molecular genetics of the bithorax complex of *Drosophila*: characterization of the products of the Abdominal-B domain. *Genes & development* 3, 1424-1436.

Centanin, L., Wittbrodt, J., 2014. Retinal neurogenesis. *Development* (Cambridge, England) 141, 241-244.

Cepko, C.L., Austin, C.P., Yang, X., Alexiades, M., Ezzeddine, D., 1996. Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 589-595.

Cleary, M.D., Doe, C.Q., 2006. Regulation of neuroblast competence: multiple temporal identity factors specify distinct neuronal fates within a single early competence window. *Genes & development* 20, 429-434.

Cornell, R.A., Ohlen, T.V., 2000. Vnd/nkx, ind/gsh, and msh/msx: conserved regulators of dorsoventral neural patterning? *Current opinion in neurobiology* 10, 63-71.

Culi, J., Aroca, P., Modolell, J., Mann, R.S., 2006. jing is required for wing development and to establish the proximo-distal axis of the leg in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 173, 255-266.

Cheah, P.Y., Chia, W., Yang, X., 2000. Jumeaux, a novel *Drosophila* winged-helix family protein, is required for generating asymmetric sibling



neuronal cell fates. *Development* (Cambridge, England) 127, 3325-3335.

Chen, S., Spletter, M., Ni, X., White, K.P., Luo, L., Long, M., Frequent Recent Origination of Brain Genes Shaped the Evolution of Foraging Behavior in *Drosophila*. *Cell Reports* 1, 118-132.

Chittka, L., Niven, J., 2009. Are bigger brains better? *Curr Biol* 19, R995-r1008.

Choksi, S.P., Southall, T.D., Bossing, T., Edoff, K., de Wit, E., Fischer, B.E., van Steensel, B., Micklem, G., Brand, A.H., 2006. Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in *Drosophila* neural stem cells. *Developmental cell* 11, 775-789.

Chu-LaGraff, Q., Doe, C.Q., 1993. Neuroblast specification and formation regulated by wingless in the *Drosophila* CNS. *Science* (New York, N.Y) 261, 1594-1597.

Chu, H., Parras, C., White, K., Jimenez, F., 1998. Formation and specification of ventral neuroblasts is controlled by vnd in *Drosophila* neurogenesis. *Genes & development* 12, 3613-3624.

**D**alton, D., Chadwick, R., McGinnis, W., 1989. Expression and embryonic function of empty spiracles: a *Drosophila* homeo box gene with two patterning functions on the anterior-posterior axis of the embryo. *Genes & development* 3, 1940-1956.

Dasen, J.S., Jessell, T.M., 2009. Hox networks and the origins of motor neuron diversity. *Cu-*

*rrrent topics in developmental biology* 88, 169-200.

Dasen, J.S., Liu, J.P., Jessell, T.M., 2003. Motor neuron columnar fate imposed by sequential phases of Hox-c activity. *Nature* 425, 926-933.

Davis-Dusenbery, B.N., Williams, L.A., Klim, J.R., Eggan, K., 2014. How to make spinal motor neurons. *Development* (Cambridge, England) 141, 491-501.

De Graeve, F., Jagla, T., Daponte, J.-P., Rickert, C., Dastugue, B., Urban, J., Jagla, K., 2004. The ladybird homeobox genes are essential for the specification of a subpopulation of neural cells. *Developmental biology* 270, 122-134.

De Robertis, E.M., 2008. Evo-devo: variations on ancestral themes. *Cell* 132, 185-195.

De Robertis, E.M., Sasai, Y., 1996. A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria. *Nature* 380, 37-40.

Desai, A.R., McConnell, S.K., 2000. Progressive restriction in fate potential by neural progenitors during cerebral cortical development. *Development* (Cambridge, England) 127, 2863-2872.

Dewey, E.M., McNabb, S.L., Ewer, J., Kuo, G.R., Takanishi, C.L., Truman, J.W., Honegger, H.W., 2004. Identification of the gene encoding bursicon, an insect neuropeptide responsible for cuticle sclerotization and wing spreading. *Curr Biol* 14, 1208-1213.

Dick, T., Yang, X.H., Yeo, S.L., Chia, W., 1991. Two closely linked *Drosophila* POU domain

genes are expressed in neuroblasts and sensory elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 7645-7649.

Doe, C.Q., 1992. Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system. *Development (Cambridge, England)* 116, 855-863.

Dorfman, R., Glazer, L., Weihe, U., Wernet, M.F., Shilo, B.Z., 2002. Elbow and Noc define a family of zinc finger proteins controlling morphogenesis of specific tracheal branches. *Development (Cambridge, England)* 129, 3585-3596.

Draizen, T.A., Ewer, J., Robinow, S., 1999. Genetic and hormonal regulation of the death of peptidergic neurons in the *Drosophila* central nervous system. *Journal of neurobiology* 38, 455-465.

Drysdale, R., FlyBase, C., 2008. FlyBase : a database for the *Drosophila* research community, pp. 45-59.

Egger, B., Chell, J.M., Brand, A.H., 2008. Insights into neural stem cell biology from flies. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 363, 39-56.

Elliott, J., Jolicoeur, C., Ramamurthy, V., Cayouette, M., 2008. Ikaros confers early temporal competence to mouse retinal progenitor cells. *Neuron* 60, 26-39.

Estacio-Gomez, A., Diaz-Benjumea, F.J., 2013. Roles of Hox genes in the patterning of the cen-

tral nervous system of *Drosophila*. *Fly* 8.

Estacio-Gomez, A., Moris-Sanz, M., Schafer, A.K., Perea, D., Herrero, P., Diaz-Benjumea, F.J., 2013. Bithorax-complex genes sculpt the pattern of leucokinergic neurons in the *Drosophila* central nervous system. *Development (Cambridge, England)* 140, 2139-2148.

Ewer, J., Truman, J.W., 1996. Increases in cyclic 3', 5'-guanosine monophosphate (cGMP) occur at ecdysis in an evolutionarily conserved crustacean cardioactive peptide-immunoreactive insect neuronal network. *The Journal of comparative neurology* 370, 330-341.

Fasano, L., Roder, L., Core, N., Alexandre, E., Vola, C., Jacq, B., Kerridge, S., 1991. The gene *teashirt* is required for the development of *Drosophila* embryonic trunk segments and encodes a protein with widely spaced zinc finger motifs. *Cell* 64, 63-79.

Fishell, G., Heintz, N., 2013. The neuron identity problem: form meets function. *Neuron* 80, 602-612.

Foronda, D., Estrada, B., de Navas, L., Sanchez-Herrero, E., 2006. Requirement of abdominal-A and Abdominal-B in the developing genitalia of *Drosophila* breaks the posterior downregulation rule. *Development (Cambridge, England)* 133, 117-127.

Franco, S.J., Gil-Sanz, C., Martinez-Garay, I., Espinosa, A., Harkins-Perry, S.R., Ramos, C., Muller, U., 2012. Fate-restricted neural progenitors in the mammalian cerebral cortex. *Science (New York, N.Y)* 337, 746-749.

Franco, S.J., Muller, U., 2013. Shaping our minds: stem and progenitor cell diversity in the mammalian neocortex. *Neuron* 77, 19-34.

**G**araulet, D.L., Castellanos, M.C., Bejarano, F., Sanfilippo, P., Tyler, D.M., Allan, D.W., Sanchez-Herre-ro, E., Lai, E.C., 2014. Homeotic Function of *Drosophila* Bithorax-Complex miRNAs Mediates Fertility by Restricting Multiple Hox Genes and TALE Cofactors in the CNS. *Developmental cell* 29, 635-648.

Gebelein, B., Mann, R.S., 2007. Compartmental modulation of abdominal Hox expression by engrailed and sloppy-paired patterns the fly ectoderm. *Developmental biology* 308, 593-605.

Golembo, M., Raz, E., Shilo, B.Z., 1996. The *Drosophila* embryonic midline is the site of Spitz processing, and induces activation of the EGF receptor in the ventral ectoderm. *Development (Cambridge, England)* 122, 3363-3370.

Green, M.R.M.R.a.S., Joseph and Cold Spring Harbor Laboratory 2012. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Greenspan, R.J., 2004. *Fly pushing: The theory and practice of Drosophila genetics*.

Grosskortenhaus, R., Pearson, B.J., Marusich, A., Doe, C.Q., 2005. Regulation of temporal identity transitions in *Drosophila* neuroblasts. *Developmental cell* 8, 193-202.

Grosskortenhaus, R., Robinson, K.J., Doe, C.Q., 2006. Pdm and Castor specify late-born motor neuron identity in the NB7-1 lineage.

*Genes & development* 20, 2618-2627.

Gummalla, M., Maeda, R.K., Castro Alvarez, J.J., Gyurkovics, H., Singari, S., Edwards, K.A., Karch, F., Bender, W., 2012. abd-A regulation by the iab-8 noncoding RNA. *PLoS genetics* 8, e1002720.

Guillemot, F., 2007. Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes. *Development (Cambridge, England)* 134, 3771-3780.

**H**an, W., Sestan, N., 2013. Cortical projection neurons: sprung from the same root. *Neuron* 80, 1103-1105.

Hartenstein, V., 1993. *Atlas of Drosophila development*.

Hartmann, B., Hirth, F., Walldorf, U., Reichert, H., 2000. Expression, regulation and function of the homeobox gene empty spiracles in brain and ventral nerve cord development of *Drosophila*. *Mechanisms of development* 90, 143-153.

Hartmann, B., Reichert, H., Walldorf, U., 2001. Interaction of gap genes in the *Drosophila* head: tailless regulates expression of empty spiracles in early embryonic patterning and brain development. *Mechanisms of development* 109, 161-172.

Heckscher, E.S., Long, F., Layden, M.J., Chuang, C.H., Manning, L., Richart, J., Pearson, J.C., Crews, S.T., Peng, H., Myers, E., Doe, C.Q., 2014. Atlas-builder software and the eNeuro atlas: resources for developmental biology and neuroscience. *Development (Cam-*

bridge, England) 141, 2524-2532.

Higashijima, S., Shishido, E., Matsuzaki, M., Saigo, K., 1996. eagle, a member of the steroid receptor gene superfamily, is expressed in a subset of neuroblasts and regulates the fate of their putative progeny in the Drosophila CNS. *Development (Cambridge, England)* 122, 527-536.

Hirono, K., Margolis, J.S., Posakony, J.W., Doe, C.Q., 2012. Identification of hunchback cis-regulatory DNA conferring temporal expression in neuroblasts and neurons. *Gene Expr Patterns* 12, 11-17.

Hirth, F., Hartmann, B., Reichert, H., 1998. Homeotic gene action in embryonic brain development of Drosophila. *Development (Cambridge, England)* 125, 1579-1589.

Hirth, F., Loop, T., Egger, B., Miller, D.F., Kaufman, T.C., Reichert, H., 2001. Functional equivalence of Hox gene products in the specification of the tritocerebrum during embryonic brain development of Drosophila. *Development (Cambridge, England)* 128, 4781-4788.

Hirth, F., Therianos, S., Loop, T., Gehring, W.J., Reichert, H., Furukubo-Tokunaga, K., 1995. Developmental defects in brain segmentation caused by mutations of the homeobox genes orthodenticle and empty spiracles in Drosophila. *Neuron* 15, 769-778.

Hobert, O., 2008. Regulatory logic of neuronal diversity: terminal selector genes and selector motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 20067-20071.

Hobert, O., Carrera, I., Stefanakis, N., 2010. The molecular and gene regulatory signature of a neuron. *Trends in neurosciences* 33, 435-445.

Holland, L.Z., Carvalho, J.E., Escriva, H., Laudet, V., Schubert, M., Shimeld, S.M., Yu, J.K., 2013. Evolution of bilaterian central nervous systems: a single origin? *EvoDevo* 4, 27.

Homem, C.C., Knoblich, J.A., Drosophila neuroblasts: a model for stem cell biology. *Development (Cambridge, England)* 139, 4297-4310.

Housden, B.E., Millen, K., Bray, S.J., 2012. Drosophila Reporter Vectors Compatible with PhiC31 Integrase Transgenesis Techniques and Their Use to Generate New Notch Reporter Fly Lines. *G3 (Bethesda, Md.)* 2, 79-82.

Hoyle, J., Tang, Y.P., Wielllette, E.L., Wardle, F.C., Sive, H., 2004. nlz gene family is required for hindbrain patterning in the zebrafish. *Dev Dyn* 229, 835-846.

Huff, R., Furst, A., Mahowald, A.P., 1989. Drosophila embryonic neuroblasts in culture: autonomous differentiation of specific neurotransmitters. *Developmental biology* 134, 146-157.

Isshiki, T., Pearson, B., Holbrook, S., Doe, C.Q., 2001. Drosophila neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny. *Cell* 106, 511-521.

**I**sshiki, T., Takeichi, M., Nose, A., 1997. The role of the *msh* homeobox gene during *Drosophila* neurogenesis: implication for the dorsoventral specification of the neuroectoderm. *Development* (Cambridge, England) 124, 3099-3109.

**J**enett, A., Rubin, G.M., Ngo, T.T., Shepherd, D., Murphy, C., Dionne, H., Pfeiffer, B.D., Cavallaro, A., Hall, D., Jeter, J., Iyer, N., Fetter, D., Hausenfluck, J.H., Peng, H., Trautman, E.T., Svirskas, R.R., Myers, E.W., Iwinski, Z.R., Aso, Y., DePasquale, G.M., Enos, A., Hulamm, P., Lam, S.C., Li, H.H., Lavery, T.R., Long, F., Qu, L., Murphy, S.D., Rockicki, K., Safford, T., Shaw, K., Simpson, J.H., Sowell, A., Tae, S., Yu, Y., Zugates, C.T., 2012. A GAL4-driver line resource for *Drosophila* neurobiology. *Cell Rep* 2, 991-1001.

Ji, S.J., Periz, G., Sockanathan, S., 2009. *Nolx1* is induced by retinoid signals and controls motoneuron subtype identity through distinct repressor activities. *Development* (Cambridge, England) 136, 231-240.

**K**ambadur, R., Koizumi, K., Stivers, C., Nagle, J., Poole, S.J., Odenwald, W.F., 1998. Regulation of POU genes by *castor* and *hunchback* establishes layered compartments in the *Drosophila* CNS. *Genes & development* 12, 246-260.

Kanai, M.I., Okabe, M., Hiromi, Y., 2005. *seven-up* Controls switching of transcription factors that specify temporal identities of *Drosophila* neuroblasts. *Developmental cell* 8, 203-213.

Karcavich, R., Doe, C.Q., 2005. *Drosophila*

neuroblast 7-3 cell lineage: a model system for studying programmed cell death, Notch/Numb signaling, and sequential specification of ganglion mother cell identity. *The Journal of comparative neurology* 481, 240-251.

Karch, F., Bender, W., Weiffenbach, B., 1990. *abdA* expression in *Drosophila* embryos. *Genes & development* 4, 1573-1587.

Kim, Y.J., Zitnan, D., Galizia, C.G., Cho, K.H., Adams, M.E., 2006. A command chemical triggers an innate behavior by sequential activation of multiple peptidergic ensembles. *Curr Biol* 16, 1395-1407.

Kohwi, M., Lupton, J.R., Lai, S.L., Miller, M.R., Doe, C.Q., 2013. Developmentally regulated subnuclear genome reorganization restricts neural progenitor competence in *Drosophila*. *Cell* 152, 97-108.

**L**ahr, E.C., Dean, D., Ewer, J., 2012. Genetic analysis of ecdysis behavior in *Drosophila* reveals partially overlapping functions of two unrelated neuropeptides. *J Neurosci* 32, 6819-6829.

Lateef, S.S., Gupta, S., Jayathilaka, L.P., Krishnanchettiar, S., Huang, J.S., Lee, B.S., 2007. An improved protocol for coupling synthetic peptides to carrier proteins for antibody production using DMF to solubilize peptides. *Journal of biomolecular techniques : JBT* 18, 173-176.

Laugier, E., Yang, Z., Fasano, L., Kerridge, S., Vola, C., 2005. A critical role of *teashirt* for patterning the ventral epidermis is masked by ectopic expression of *tiptop*, a paralog of *teashirt* in *Drosophila*. *Developmental biology* 283,

446-458.

Le Dreau, G., Marti, E., 2012. Dorsal-ventral patterning of the neural tube: a tale of three signals. *Developmental neurobiology* 72, 1471-1481.

Lee, C.Y., Robinson, K.J., Doe, C.Q., 2006. Lgl, Pins and aPKC regulate neuroblast self-renewal versus differentiation. *Nature* 439, 594-598.

Levine, R.B., Morton, D.B., Restifo, L.L., 1995. Remodeling of the insect nervous system. *Current opinion in neurobiology* 5, 28-35.

Lewis, R.A., Wakimoto, B.T., Denell, R.E., Kaufman, T.C., 1980. Genetic Analysis of the Antennapedia Gene Complex (Ant-C) and Adjacent Chromosomal Regions of DROSOPHILA MELANOGASTER. II. Polytene Chromosome Segments 84A-84B1,2. *Genetics* 95, 383-397.

Li, H.H., Kroll, J.R., Lennox, S.M., Ogundeyi, O., Jeter, J., Depasquale, G., Truman, J.W., 2014. A GAL4 Driver Resource for Developmental and Behavioral Studies on the Larval CNS of Drosophila. *Cell Rep* 8, 897-908.

Lichtneckert, R., Bello, B., Reichert, H., 2007. Cell lineage-specific expression and function of the empty spiracles gene in adult brain development of Drosophila melanogaster. *Development (Cambridge, England)* 134, 1291-1300.

Lichtneckert, R., Reichert, H., 2005. Insights into the urbilaterian brain: conserved genetic patterning mechanisms in insect and vertebrate brain development. *Heredity* 94, 465-477.

Lin, S., Lee, T., 2012. Generating neuronal diversity in the Drosophila central nervous system. *Dev Dyn* 241, 57-68.

Lopez-Munoz, F., Boya, J., Alamo, C., 2006. Neuron theory, the cornerstone of neuroscience, on the centenary of the Nobel Prize award to Santiago Ramon y Cajal. *Brain research bulletin* 70, 391-405.

Luan, H., Lemon, W.C., Peabody, N.C., Pohl, J.B., Zelensky, P.K., Wang, D., Nitabach, M.N., Holmes, T.C., White, B.H., 2006a. Functional dissection of a neuronal network required for cuticle tanning and wing expansion in Drosophila. *J Neurosci* 26, 573-584.

Luan, H., Peabody, N.C., Vinson, C.R., White, B.H., 2006b. Refined spatial manipulation of neuronal function by combinatorial restriction of transgene expression. *Neuron* 52, 425-436.

Luer, K., Technau, G.M., 2009. Single cell cultures of Drosophila neuroectodermal and mesectodermal central nervous system progenitors reveal different degrees of developmental autonomy. *Neural development* 4, 30.

Lundell, M.J., Lee, H.K., Perez, E., Chadwell, L., 2003. The regulation of apoptosis by Numb/Notch signaling in the serotonin lineage of Drosophila. *Development (Cambridge, England)* 130, 4109-4121.

Luo, C.W., Dewey, E.M., Sudo, S., Ewer, J., Hsu, S.Y., Honegger, H.W., Hsueh, A.J., 2005. Bursicon, the insect cuticle-hardening hormone, is a heterodimeric cystine knot protein that activates G protein-coupled receptor LGR2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*



ces of the United States of America 102, 2820-2825.

Lupo, G., Harris, W.A., Lewis, K.E., 2006. Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system. *Nature reviews. Neuroscience* 7, 103-114.

**M**acias, A., Casanova, J., Morata, G., 1990. Expression and regulation of the abd-A gene of *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)* 110, 1197-1207.

Mallo, M., Alonso, C.R., 2013. The regulation of Hox gene expression during animal development. *Development (Cambridge, England)* 140, 3951-3963.

Mann, R.S., Lelli, K.M., Joshi, R., 2009. Hox specificity unique roles for cofactors and collaborators. *Current topics in developmental biology* 88, 63-101.

Manning, L., Heckscher, E.S., Purice, M.D., Roberts, J., Bennett, A.L., Kroll, J.R., Pollard, J.L., Strader, M.E., Lupton, J.R., Dyukareva, A.V., Doan, P.N., Bauer, D.M., Wilbur, A.N., Tanner, S., Kelly, J.J., Lai, S.L., Tran, K.D., Kohwi, M., Lavery, T.R., Pearson, J.C., Crews, S.T., Rubin, G.M., Doe, C.Q., 2012. A resource for manipulating gene expression and analyzing cis-regulatory modules in the *Drosophila* CNS. *Cell Rep* 2, 1002-1013.

Mardon, G., Solomon, N.M., Rubin, G.M., 1994. *dachshund* encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila*. *Development (Cambridge, En-*

*gland)* 120, 3473-3486.

Masland, R.H., 2004. Neuronal cell types. *Curr Biol* 14, R497-500.

Maurange, C., Cheng, L., Gould, A.P., 2008. Temporal transcription factors and their targets schedule the end of neural proliferation in *Drosophila*. *Cell* 133, 891-902.

McDonald, J.A., Holbrook, S., Isshiki, T., Weiss, J., Doe, C.Q., Mellerick, D.M., 1998. Dorsoventral patterning in the *Drosophila* central nervous system: the *vnd* homeobox gene specifies ventral column identity. *Genes & development* 12, 3603-3612.

McGinnis, W., Krumlauf, R., 1992. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68, 283-302.  
McGuire, S.E., Le, P.T., Osborn, A.J., Matsu-  
moto, K., Davis, R.L., 2003. Spatiotemporal  
rescue of memory dysfunction in *Drosophila*.  
*Science (New York, N.Y)* 302, 1765-1768.

McNeil, G.P., Zhang, X., Genova, G., Jackson, F.R., 1998. A molecular rhythm mediating circadian clock output in *Drosophila*. *Neuron* 20, 297-303.

Mettler, U., Vogler, G., Urban, J., 2006. Timing of identity: spatiotemporal regulation of *hunchback* in neuroblast lineages of *Drosophila* by *Seven-up* and *Prospero*. *Development (Cambridge, England)* 133, 429-437.

Michelson, A.M., 1994. Muscle pattern diversification in *Drosophila* is determined by the autonomous function of homeotic genes in the embryonic mesoderm. *Development (Cambridge, England)* 120, 755-768.



Miguel-Aliaga, I., Thor, S., 2004. Segment-specific prevention of pioneer neuron apoptosis by cell-autonomous, postmitotic Hox gene activity. *Development* (Cambridge, England) 131, 6093-6105.

Monastirioti, M., Giagtzoglou, N., Koumbanakis, K.A., Zacharioudaki, E., Deligiannaki, M., Wech, I., Almeida, M., Preiss, A., Bray, S., Delidakis, C., 2010. *Drosophila* Hey is a target of Notch in asymmetric divisions during embryonic and larval neurogenesis. *Development* (Cambridge, England) 137, 191-201.

**N**assel, D.R., Winther, A.M., 2010. *Drosophila* neuropeptides in regulation of physiology and behavior. *Progress in neurobiology* 92, 42-104.

Ng, M., Diaz-Benjumea, F.J., Vincent, J.P., Wu, J., Cohen, S.M., 1996. Specification of the wing by localized expression of wingless protein. *Nature* 381, 316-318.

**O**'Connor-Giles, K.M., Skeath, J.B., 2003. Numb inhibits membrane localization of Sanpodo, a four-pass transmembrane protein, to promote asymmetric divisions in *Drosophila*. *Developmental cell* 5, 231-243.

**P**ark, D., Veenstra, J.A., Park, J.H., Taghert, P.H., 2008. Mapping peptidergic cells in *Drosophila*: where DIMM fits in. *PloS one* 3, e1896.

Park, J.H., Schroeder, A.J., Helfrich-Forster, C., Jackson, F.R., Ewer, J., 2003. Targeted ablation of CCAP neuropeptide-containing neurons of

*Drosophila* causes specific defects in execution and circadian timing of ecdysis behavior. *Development* (Cambridge, England) 130, 2645-2656.

Park, Y., Kim, Y.J., Adams, M.E., 2002. Identification of G protein-coupled receptors for *Drosophila* PRXamide peptides, CCAP, corazonin, and AKH supports a theory of ligand-receptor coevolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11423-11428.

Peabody, N.C., Diao, F., Luan, H., Wang, H., Dewey, E.M., Honegger, H.W., White, B.H., 2008. Bursicon functions within the *Drosophila* CNS to modulate wing expansion behavior, hormone secretion, and cell death. *J Neurosci* 28, 14379-14391.

Pearson, B.J., Doe, C.Q., 2003. Regulation of neuroblast competence in *Drosophila*. *Nature* 425, 624-628.

Peng, H., Chung, P., Long, F., Qu, L., Jenett, A., Seeds, A.M., Myers, E.W., Simpson, J.H., 2011. BrainAligner: 3D registration atlases of *Drosophila* brains. *Nature methods* 8, 493-500.

Pfeiffer, B.D., Jenett, A., Hammonds, A.S., Ngo, T.T., Misra, S., Murphy, C., Scully, A., Carlson, J.W., Wan, K.H., Lavery, T.R., Mungall, C., Svirskas, R., Kadonaga, J.T., Doe, C.Q., Eisen, M.B., Celniker, S.E., Rubin, G.M., 2008. Tools for neuroanatomy and neurogenetics in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 9715-9720.

Prokop, A., Bray, S., Harrison, E., Technau,

G.M., 1998. Homeotic regulation of segment-specific differences in neuroblast numbers and proliferation in the *Drosophila* central nervous system. *Mechanisms of development* 74, 99-110.

Pueyo, J.I., Couso, J.P., 2004. Chip-mediated partnerships of the homeodomain proteins Bar and Aristaless with the LIM-HOM proteins Apterous and Lim1 regulate distal leg development. *Development (Cambridge, England)* 131, 3107-3120.

**R**amain, P., Heitzler, P., Haenlin, M., Simpson, P., 1993. pannier, a negative regulator of achaete and scute in *Drosophila*, encodes a zinc finger protein with homology to the vertebrate transcription factor GATA-1. *Development (Cambridge, England)* 119, 1277-1291.

Roder, L., Vola, C., Kerridge, S., 1992. The role of the teashirt gene in trunk segmental identity in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)* 115, 1017-1033.

Rogulja-Ortmann, A., Luer, K., Seibert, J., Rickert, C., Technau, G.M., 2007. Programmed cell death in the embryonic central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development (Cambridge, England)* 134, 105-116.

Rogulja-Ortmann, A., Renner, S., Technau, G.M., 2008. Antagonistic roles for Ultrabithorax and Antennapedia in regulating segment-specific apoptosis of differentiated motoneurons in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *Development (Cambridge, England)* 135, 3435-3445.

Rogulja-Ortmann, A., Technau, G.M., 2008.

Multiple roles for Hox genes in segment-specific shaping of CNS lineages. *Fly* 2, 316-319.

**S**anchez-Herrero, E., Vernos, I., Marco, R., Morata, G., 1985. Genetic organization of *Drosophila bithorax* complex. *Nature* 313, 108-113.

Schmid, A., Chiba, A., Doe, C.Q., 1999. Clonal analysis of *Drosophila* embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections and muscle targets. *Development (Cambridge, England)* 126, 4653-4689.

Schmidt, H., Rickert, C., Bossing, T., Vef, O., Urban, J., Technau, G.M., 1997. The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm. *Developmental biology* 189, 186-204.

Schneider, L.E., Sun, E.T., Garland, D.J., Taghert, P.H., 1993. An immunocytochemical study of the FMRFamide neuropeptide gene products in *Drosophila*. *The Journal of comparative neurology* 337, 446-460.

Schnepp, B., Grumblin, G., Donaldson, T., Simcox, A., 1996. Vein is a novel component in the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway with similarity to the neuregulins. *Genes & development* 10, 2302-2313.

Skeath, J.B., 1998. The *Drosophila* EGF receptor controls the formation and specification of neuroblasts along the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* embryo. *Development (Cambridge, England)* 125, 3301-3312.

Skeath, J.B., 1999. At the nexus between pat-

tern formation and cell-type specification: the generation of individual neuroblast fates in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *Bioessays* 21, 922-931.

Skeath, J.B., Doe, C.Q., 1998. Sanpodo and Notch act in opposition to Numb to distinguish sibling neuron fates in the *Drosophila* CNS. *Development* (Cambridge, England) 125, 1857-1865.

Skeath, J.B., Panganiban, G.F., Carroll, S.B., 1994. The ventral nervous system defective gene controls proneural gene expression at two distinct steps during neuroblast formation in *Drosophila*. *Development* (Cambridge, England) 120, 1517-1524.

Skeath, J.B., Thor, S., 2003. Genetic control of *Drosophila* nerve cord development. *Current opinion in neurobiology* 13, 8-15.

Skeath, J.B., Zhang, Y., Holmgren, R., Carroll, S.B., Doe, C.Q., 1995. Specification of neuroblast identity in the *Drosophila* embryonic central nervous system by gooseberry-distal. *Nature* 376, 427-430.

St Pierre, S.E., Galindo, M.I., Couso, J.P., Thor, S., 2002. Control of *Drosophila* imaginal disc development by rotund and roughened eye: differentially expressed transcripts of the same gene encoding functionally distinct zinc finger proteins. *Development* (Cambridge, England) 129, 1273-1281.

Suska, A., Miguel-Aliaga, I., Thor, S., Segment-specific generation of *Drosophila* Capability neuropeptide neurons by multi-faceted Hox cues. 2011. *Developmental biology* 353, 72-80.

Technau, G.M., Berger, C., Urbach, R., 2006. Generation of cell diversity and segmental pattern in the embryonic central nervous system of *Drosophila*. *Dev Dyn* 235, 861-869.

Terriente Felix, J., Magarinos, M., Diaz-Benjumea, F.J., 2007. Nab controls the activity of the zinc-finger transcription factors Squeeze and Rotund in *Drosophila* development. *Development* (Cambridge, England) 134, 1845-1852.

Terriente, J., Perea, D., Suzanne, M., Diaz-Benjumea, F.J., 2008. The *Drosophila* gene *zfh2* is required to establish proximal-distal domains in the wing disc. *Developmental biology* 320, 102-112.

Thor, S., Thomas, J.B., 1997. The *Drosophila* islet gene governs axon pathfinding and neurotransmitter identity. *Neuron* 18, 397-409.

Tran, K.D., Doe, C.Q., 2008. Pdm and Castor close successive temporal identity windows in the NB3-1 lineage. *Development* (Cambridge, England) 135, 3491-3499.

Tsuji, T., Hasegawa, E., Isshiki, T., 2008. Neuroblast entry into quiescence is regulated intrinsically by the combined action of spatial Hox proteins and temporal identity factors. *Development* (Cambridge, England) 135, 3859-3869.

Truman, J.W., Moats, W., Altman, J., Marin, E.C., Williams, D.W., 2010. Role of Notch signaling in establishing the hemilineages of secondary neurons in *Drosophila melanogaster*. *Development* (Cambridge, England) 137, 53-61.

Udolph, G., 2012. Notch signaling and the generation of cell diversity in *Drosophila* neuroblast lineages. *Advances in experimental medicine and biology* 727, 47-60.

Udolph, G., Luer, K., Bossing, T., Technau, G.M., 1995. Commitment of CNS progenitors along the dorsoventral axis of *Drosophila* neuroectoderm. *Science (New York, N.Y.)* 269, 1278-1281.

Udolph, G., Rath, P., Tio, M., Toh, J., Fang, W., Pandey, R., Technau, G.M., Chia, W., 2009. On the roles of Notch, Delta, kuzbanian, and inscuteable during the development of *Drosophila* embryonic neuroblast lineages. *Developmental biology* 336, 156-168.

Ulloa, F., Briscoe, J., 2007. Morphogens and the control of cell proliferation and patterning in the spinal cord. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 6, 2640-2649.

Urbach, R., Technau, G.M., 2008. Dorsoventral patterning of the brain: a comparative approach. *Advances in experimental medicine and biology* 628, 42-56.

Veverytsa, L., Allan, D.W., 2011. Retrograde BMP signaling controls *Drosophila* behavior through regulation of a peptide hormone battery. *Development (Cambridge, England)* 138, 3147-3157.

Veverytsa, L., Allan, D.W., 2012. Temporally tuned neuronal differentiation supports the functional remodeling of a neuronal network in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E748-756.

my of Sciences of the United States of America 109, E748-756.

Veverytsa, L., Allan, D.W., 2013. Subtype-specific neuronal remodeling during *Drosophila* metamorphosis. *Fly* 7, 78-86.

Vomel, M., Wegener, C., 2007. Neurotransmitter-induced changes in the intracellular calcium concentration suggest a differential central modulation of CCAP neuron subsets in *Drosophila*. *Developmental neurobiology* 67, 792-808.

von Ohlen, T., Doe, C.Q., 2000. Convergence of dorsal, dpp, and egfr signaling pathways subdivides the *drosophila* neuroectoderm into three dorsal-ventral columns. *Developmental biology* 224, 362-372.

Walldorf, U., Gehring, W.J., 1992. Empty spiracles, a gap gene containing a homeobox involved in *Drosophila* head development. *The EMBO journal* 11, 2247-2259.

Weihe, U., Dorfman, R., Wernet, M.F., Cohen, S.M., Milan, M., 2004. Proximodistal subdivision of *Drosophila* legs and wings: the elbow-no ocelli gene complex. *Development (Cambridge, England)* 131, 767-774.

Weiss, J.B., Von Ohlen, T., Mellerick, D.M., Dressler, G., Doe, C.Q., Scott, M.P., 1998. Dorsoventral patterning in the *Drosophila* central nervous system: the intermediate neuroblasts defective homeobox gene specifies intermediate column identity. *Genes & development* 12, 3591-3602.

White, B.H., Ewer, J., 2014. Neural and hor-

monal control of postecdysial behaviors in insects. *Annual review of entomology* 59, 363-381.

White, K., Grether, M.E., Abrams, J.M., Young, L., Farrell, K., Steller, H., 1994. Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science (New York, N.Y)* 264, 677-683.

Whiteley, M., Noguchi, P.D., Sensabaugh, S.M., Odenwald, W.F., Kassis, J.A., 1992. The *Drosophila* gene *escargot* encodes a zinc finger motif found in snail-related genes. *Mechanisms of development* 36, 117-127.

Wichterle, H., Gifford, D., Mazzoni, E., 2013. Neuroscience. Mapping neuronal diversity one cell at a time. *Science (New York, N.Y)* 341, 726-727.

Williams, R.W., Herrup, K., 1988. The control of neuron number. *Annual review of neuroscience* 11, 423-453.

Winbush, A., Weeks, J.C., 2011. Steroid-triggered, cell-autonomous death of a *Drosophila* motoneuron during metamorphosis. *Neural development* 6, 15.

Wright, A.P., Fox, A.N., Johnson, K.G., Zinn, K., 2010. Systematic screening of *Drosophila* deficiency mutations for embryonic phenotypes and orphan receptor ligands. *PloS one* 5, e12288.

**Y**amanaka, N., Rewitz, K.F., O'Connor, M.B., 2013. Ecdysone control of developmental transitions: lessons from *Drosophila* research. *Annual review of entomology* 58, 497-516.

Yang, X., Bahri, S., Klein, T., Chia, W., 1997. Klumpfuss, a putative *Drosophila* zinc finger transcription factor, acts to differentiate between the identities of two secondary precursor cells within one neuroblast lineage. *Genes & development* 11, 1396-1408.

Younossi-Hartenstein, A., Green, P., Liaw, G.J., Rudolph, K., Lengyel, J., Hartenstein, V., 1997. Control of early neurogenesis of the *Drosophila* brain by the head gap genes *tll*, *otd*, *ems*, and *btd*. *Developmental biology* 182, 270-283.

**Z**hang, X., McNeil, G.P., Hilderbrand-Chae, M.J., Franklin, T.M., Schroeder, A.J., Jackson, F.R., 2000. Circadian regulation of the lark RNA-binding protein within identifiable neurosecretory cells. *Journal of neurobiology* 45, 14-29.

Zhao, G., Wheeler, S.R., Skeath, J.B., 2007. Genetic control of dorsoventral patterning and neuroblast specification in the *Drosophila* Central Nervous System. *The International journal of developmental biology* 51, 107-115.



# Anexo 1:tablas y figuras

---





# 1.Tabla 1: Resume de los fenotipos presentados en este trabajo

		Subesófago			Tórax			Abdomen		
		n	media	des.	n	media	des.	n	media	des.
Genes columnares	<i>silvestre</i>	70	2,8	0,5	73	3,9	0,2	74	7,7	1,6
	<i>silvestre</i> (#)	20	3,0	0,0	20	4,0	0,0	20	10,4	1,9
	<i>vnd</i> <sup>6</sup>	13	2,0	0,4	18	3,3	1,3	16	6,8 <sup>†</sup>	0,4
	<i>ind</i> <sup>l6.2</sup>	28	0,7*	0,7	29	0,2*	0,5	29	0,2*	0,5
	<i>Msh</i> <sup>D68</sup>	13	2,6	0,5	13	3,8	0,3	13	7,4	0,6
Genes homeóticos	<i>sca-Gal4 UAS-ind</i>	12	2,9	0,3	12	4,0	0,0	17	6,8 <sup>†</sup>	0,8
	<i>sca-Gal4 UAS-Msh<sup>m25-m6</sup></i>	14	2,8	0,9	15	3,6	0,6	20	6,5 <sup>†</sup>	1,2
	<i>lab</i> <sup>4</sup>	20	2,8	0,5	20	3,8	0,5	20	6,8 <sup>†</sup>	0,7
	<i>pb</i> <sup>10</sup>	12	2,6	0,5	14	3,9	0,3	14	6,5 <sup>†</sup>	0,9
	<i>Dfd</i> <sup>l</sup>	20	2,8	0,6	21	3,9	0,2	20	8,5	1,1
	<i>Scr</i> <sup>4</sup>	10	3,1	0,3	10	3,7	0,5	10	6,7 <sup>†</sup>	0,7
	<i>Antp</i> <sup>14</sup>	26	3,1 <sup>†</sup>	0,5	26	4,1	0,7	10	7,4	0,7
	<i>Ubx</i> <sup>6.28</sup>	15	3,0 <sup>†</sup>	0,0	15	3,2*	0,4	15	6,9	1,6
	<i>Ubx</i> <sup>6.28</sup> (#)	20	3,2	0,5	20	3,0*	0,0	20	9,45	1,3
	<i>Df(3L)H99</i>	9	5,4 <sup>†</sup>	1,8	10	4,2	1,2	8	6,5	1,5
	<i>Df(3L)H99</i> (#)	9	4,5*	0,5	11	5,8*	0,6	11	9,9	1,8
	<i>Df(3L)H99 Ubx</i> <sup>6.28</sup> (#)	10	4,9*	1,4	10	5,1*	1,0	10	10,2	1,5
	<i>Ubx</i> <sup>MX6</sup> <i>abd-A</i> <sup>M1</sup>	21	2,9	0,4	23	2,8*	0,5	21	6,9 <sup>†</sup>	0,6
	<i>Ubx</i> <sup>MX6</sup> <i>abd-A</i> <sup>M1</sup> (#)	11	2,9	0,3	14	3,0*	0,0	14	7,0*	0,0
	<i>abd-A</i> <sup>M1</sup>	25	2,9	0,4	33	3,5	1,1	32	6,9 <sup>†</sup>	0,5
	<i>Abd-B</i> <sup>M1</sup>	19	3,0	0,3	19	4,0	0,0	19	10,5*	1,7
	<i>Abd-B</i> <sup>M1</sup> (#)	19	3,0	0,3	19	4,0	0,0	19	16*	2,3
	<i>Ubx</i> <sup>922</sup> <i>Abd-B</i> <sup>M5</sup> (#)	11	3,0*	0,0	11	3,0*	0,0	11	12,5*	0,7
	<i>Ubx</i> <sup>l</sup> <i>abd-A</i> <sup>P24</sup>	8	3,0 <sup>†</sup>	0,0	8	3,0*	0,0	8	7,0*	0,0
	<i>Abd-B</i> <sup>D18</sup> (#)									
	<i>elav-Gal4 UAS-Abd-B-RNAi</i> <sup>l2024</sup> (#)	18	3,1	0,4	28	4,0	0,0	36	14,6*	1,4
	<i>worn-G4 UAS-lab</i>	49	3,0 <sup>†</sup>	0,2	49	3,8	0,4	43	7,1	1,5
	<i>worn-G4 UAS-pb</i>	15	2,8	0,5	17	3,8	0,3	17	8,0	1,0
	<i>worn-G4 UAS-Dfd</i> <sup>W4</sup>	15	2,9	0,2	18	3,7	0,4	19	7,1	0,9
	<i>worn-G4 UAS-Scr</i>	15	2,7	0,4	15	3,9	0,2	16	8,1	1,2
	<i>worn-G4 UAS-Antp</i>	15	3,0	0,6	14	3,9	0,5	18	7,1	2,0
	<i>worn-G4 UAS-Ubx</i> <sup>LA1</sup>	33	2,7	0,8	33	3,5	1,0	18	7,8	1,6
	<i>worn-G4 UAS-abd-A</i> <sup>20-10-1</sup>	15	3,3	1,1	15	4,0	0,2	15	7,0	1,2
	<i>worn-G4 UAS-Abd-B</i> <sup>m2SG19</sup>	13	2,9	0,3	13	3,8	1,3	13	8,6	2,4

	<i>elav-G4 UAS-lab</i>	12	2,8	0,3	12	4,0	0,0	12	8,2	1,3
	<i>elav-G4 UAS-pb</i>	35	3,0 <sup>†</sup>	0,0	36	4,0	0,3	38	7,4	3,0
	<i>elav-G4 UAS-Dfd<sup>W4</sup></i>	18	3,0 <sup>†</sup>	0,0	18	3,9	0,2	19	7,4	1,0
	<i>elav-G4 UAS-Scr</i>	55	2,7	0,5	47	3,7	0,4	17	7,0	0,6
	<i>elav-G4 UAS-Antp</i>	15	2,9	0,2	16	3,8	0,2	15	7,0	0,7
	<i>elav-Gal4</i> <i>UAS-Ubx<sup>IAI</sup></i>	17	3,5*	0,5	18	5,5*	1,0	20	6,9 <sup>†</sup>	0,7
	<i>elav-Gal4 UAS-Ubx<sup>IAI</sup></i> (#)	26	3,9*	0,9	26	4,7*	0,7	26	9,5	1,2
	<i>elav-Gal4</i> <i>UAS-abd-A<sup>20-10-1</sup></i>	48	0,08*	0,28	50	0,0*	0,0	50	0,04*	0,2
	<i>elav-Gal4</i> <i>UAS-abd-A<sup>20-10-1</sup></i> (#)	20	0,3*	0,7	20	0,2*	0,5	20	0,1*	0,5
	<i>elav-Gal4</i> <i>UAS-Abd-B<sup>m2SG19</sup></i>	16	0,0*	0,0	16	0,0*	0,0	16	0,0*	0,0
	<i>elav-Gal4</i> <i>UAS-Abd-B<sup>m2SG19</sup></i> (#)	70	0,5*	0,8	70	0,5*	0,8	70	0,3*	0,8
Genes temporales	<i>hb<sup>P1</sup> hb<sup>FB</sup></i>	3	0,0*	0,0	3	0,0*	0,0	3	0,0*	0,0
	<i>hb<sup>1</sup>/hb<sup>P1</sup> hb<sup>FB</sup></i> (#)	21	0,0*	0,0	21	1,4*	0,8	21	4,8*	1,6
	<i>kr<sup>1</sup> kr<sup>CD</sup></i>	18	3,0	0,3	20	3,6	0,7	20	8,0	2,3
	<i>Df(2L)ED773 (pdm)</i>	37	3,0	0,0	38	4,0	1,0	38	6,7	2,3
	<i>cas<sup>D1</sup></i>	13	3,0	0,5	13	3,6	0,5	13	6,6	1,3
	<i>grh<sup>IM</sup></i>	14	2,9	0,3	16	3,8	0,4	16	7,2	1,0
	<i>insc-Gal4 UAS-hb<sup>F4A</sup></i>	20	7,2*	1,6	20	6,5*	0,8	20	14,2*	1,6
	<i>insc-Gal4 UAS-hb<sup>F4A</sup></i> (#)	11	6,5*	0,8	12	6,5*	0,5	12	16*	3,1
	<i>prosp-Gal4 UAS-Hb<sup>F4A</sup></i>	16	4,2*	1,4	16	4,8 <sup>†</sup>	1,2	16	10,6*	2,9
	<i>worn-Gal4 UAS-hb<sup>F4A</sup></i>	20	5,8 <sup>†</sup>	2	20	5,0*	0,0	20	12,2*	1,0
	<i>insc-Gal4 UAS-Kr</i>	19	3,0	0,2	20	3,7	0,6	20	9,6	2,5
	<i>worn-Gal4 UAS-pdm</i>	20	2,8	0,3	20	3,9	0,4	20	7,2	0,9
	<i>worn-Gal4 UAS-cas</i>	17	3,1	0,7	17	3,9	0,9	17	9,2	1,7
	<i>worn-Gal4 UAS-grh<sup>15M</sup></i>	21	2,9	0,3	21	4,2	0,6	21	8,0	1,1
	<i>elav-Gal4 UAS-hb<sup>F4A</sup></i>	17	4,1*	0,6	17	4,7*	0,7	17	7,9	1,3
	<i>elav-Gal4 UAS-hb<sup>F4A</sup></i> (#)	16	4,7*	0,5	16	5,4*	0,6	16	12,6	1,0
	<i>elav-Gal4 UAS-pdm</i>	21	2,8	0,7	20	4,0	0,3	20	8,7	1,7
	<i>elav-Gal4 UAS-cas</i>	20	2,9	0,2	20	3,8	0,3	20	8,3	1,6
	<i>elav-G4 UAS-grh<sup>15M</sup></i>	36	2,7	0,5	36	3,7	0,5	36	6,9 <sup>†</sup>	0,8
	<i>svp<sup>1</sup></i>	35	3,9*	1,1	35	5,1*	0,9	26	10,1*	2,3
	<i>svp<sup>1</sup></i> (#)	14	5,5*	1,5	14	6,1*	0,5	13	13,8*	1,4
	<i>dac<sup>4</sup></i>	21	3,0	1,0	21	3,7	0,7	21	7,6	1,1

Genes de la ruta de Notch	<i>spdo</i> <sup>G104</sup>	12	2,2	1,3	11	3,0	1,5	12	2,5*	2,0
	<i>spdo</i> <sup>G104</sup> (#)	9	3,0	1,8	9	5,2	2,5	10	9,2	2,2
	<i>jumu</i> <sup>06439</sup>	10	3,0 <sup>†</sup>	0,0	12	3,9	0,3	12	7,0 <sup>†</sup>	0,8
	<i>Hey</i> <sup>06656</sup>	17	3,0	0,4	17	3,8	0,3	17	8,7	1,5
	<i>elavG4-Umam</i> <sup>DN</sup>	23	2,9	0,2	26	3,9	0,2	26	9,0 <sup>†</sup>	1,7
	<i>elav-Gal4</i> <i>UAS-Nintra</i>	20	2,6	0,6	20	4,0	0,2	20	7,4	1,5
	<i>elavG4 UAS-Hey</i> <sup>1315</sup>	18	3,0	0,2	20	3,9	0,3	20	6,5 <sup>†</sup>	1,4
	<i>numb</i> <sup>1</sup>	10	2,8	0,4	10	3,8	0,4	9	7,0	1,1
	<i>Df(3L)H99</i>	9	5,4 <sup>†</sup>	1,8	10	4,2	1,2	8	6,5	1,5
	<i>Df(3L)H99</i> (#)	9	4,5*	0,5	11	5,8*	0,6	11	9,9	1,8
	<i>Df(3L)H99 spdo</i> <sup>G104</sup>									
Genes implicados en la especificación de las neuronas CCAP / Bursicon	<i>ems</i> <sup>1</sup>	16	1,2*	0,9	22	1,3*	1,3	24	2,0*	2,1
	<i>ems</i> <sup>1</sup> (#)	12	1*	1,3	12	1,7*	1,4	13	3,6*	2
	<i>Df(3L)H99 ems</i> <sup>1</sup>	13	2,9	0,3	13	3,8	0,3	14	7,7	1,5
	<i>isl</i> <sup>1</sup>	34	1,9*	0,8	34	1,8*	0,9	34	1,5*	2
	<i>isl</i> (#)	11	0,0*	0	11	0,3*	0,4	11	0,7*	1,1
	<i>Df(2R)tsh</i> <sup>8</sup>	22	3,0	0,5	24	2,9*	1	23	1,6*	2,4
	<i>Df(2R)tsh</i> <sup>8</sup> (#)	12	3,1	0,3	12	3,8	0,3	12	11,7	1,5
	<i>elB</i> <sup>3.3.1</sup> <i>noc</i> <sup>D64</sup>	15	2,0*	0,5	29	2,3*	1,3	29	2,4*	2,3
	<i>elB</i> <sup>3.3.1</sup> <i>noc</i> <sup>D64</sup> (#)	12	2,8	0,6	12	3,5	0,6	12	9,2	1,6
	<i>insc-G4 UAS-ems</i> <sup>15B</sup>	16	2,8	0,3	17	4,0	0,2	17	7,4	1,5
	<i>insc-G4 UAS-isl</i>	14	3,0 <sup>†</sup>	0,0	14	3,9	0,2	14	8,7	1,1
	<i>insc-G4 UAS-tsh</i>	19	3,0 <sup>†</sup>	0,0	19	3,8	0,5	20	8,8 <sup>†</sup>	1,3
	<i>insc-G4</i> <i>UAS-elB</i> <sup>EP2039</sup>	14	3,2	0,6	11	4,0	0,0	14	10,0 <sup>†</sup>	1,0
	<i>elav-Gal4 UAS-ems</i> <sup>15B</sup>	18	3,0	0,2	18	4,0	0,4	19	7,6	1,0
	<i>elav-G4 UAS-isl</i>	18	3,1 <sup>†</sup>	0,2	18	3,9	0,2	18	7,6	1,0
	<i>elav-Gal4 UAS-tsh</i>	11	2,9	0,5	11	4,0	0,0	11	8,1	1,6
	<i>elav-G4</i> <i>UAS-elB</i> <sup>EP2039</sup>	20	3,0	0,4	15	4,0	0,0	20	6,8	1,5

n: número de hemiganglios observados

media: número medio de neuronas CCAP/Bursicón por hemiganglio subesofágico, torácico y abdominal

des.: desviación típica de la media

Se analizaron los datos mediante la prueba T de student

<sup>†</sup> señala cuando las diferencias con respecto a los individuos silvestres son significativas con un p-valor< 0.01

\* señala cuando las diferencias con respecto a los individuos silvestres son significativas con un p-valor< 0.001

## 2. Table 2: Estudio de los genes cuya falta de función no altera el patrón de neuronas CCAP/Bursicón

		Subesófago			Tórax			Abdomen		
Nombre	Genotipo	n	media	des.	n	media	des.	n	media	des.
silvestre	silvestre	70	2,8	0,5	73	3,9	0,2	74	7,7	1,64
abnormal spindle	<i>asp</i> <sup>l</sup>	11	2,5	0,7	16	2,9 <sup>†</sup>	1,2	16	7,6	1,3
abrupt	<i>ab</i> <sup>1D</sup>	11	2,8	0,5	11	4,0	0,0	11	6,8 <sup>†</sup>	0,8
achaete	<i>ac</i> <sup>Hw-49c</sup>	14	2,9	0,2	14	3,9	0,3	14	8,3	1,5
apterous	<i>ap</i> <sup>P44</sup>	19	3,1	0,2	19	4,0	0,3	19	8,6	1,5
apointed	<i>apt</i> <sup>63Ea-G14</sup>	11	2,9	0,4	13	3,9	0,3	11	7,7	1,4
Arrowhead	<i>Awh</i> <sup>63Ea-G14</sup>	18	2,5	0,6	18	2,9 <sup>†</sup>	1,0	18	6,5	1,9
brother of odd with entrails limited	<i>bowl</i> <sup>l</sup>	15	2,9	0,5	16	3,7	0,5	16	7,6	1,7
charlatan	<i>Df(2R) Exel 7135</i>	10	1,6	1,4	10	4,0	0,0	10	7	0,5
capricious	<i>caps</i> <sup>65.2</sup>	20	3,2 <sup>†</sup>	0,4	20	4,1	0,4	20	7,7	0,9
Chip	<i>Chip</i> <sup>e5.5</sup>	17	3,1 <sup>†</sup>	0,2	17	3,9	0,3	17	6,3 <sup>†</sup>	0,8
collier	<i>col</i> <sup>l</sup>	15	3,1	0,6	15	3,8	0,4	15	9,1 <sup>†</sup>	1,6
crooked legs	<i>crol</i> <sup>l04418</sup>	12	2,4	0,8	13	4,2	0,4	13	8,6	2,0
daughterless	<i>da</i> <sup>l</sup>	20	2,9	0,4	18	3,8	0,4	18	6,7 <sup>†</sup>	1,1
dimmed	<i>dimm</i> <sup>P1</sup>	20	2,9	0,3	21	4,0	0,0	21	6,8 <sup>†</sup>	0,7
dissatisfaction	<i>dsf</i> <sup>f00109</sup>	12	2,9	0,3	12	3,9	0,3	18	7,1	1,4
DP transcription factor	<i>Df(2R) BSC272</i>	20	3,1 <sup>†</sup>	0,3	20	4,0	0,0	22	9,0 <sup>†</sup>	1,5
Ecdysone receptor	<i>EcR</i> <sup>Q50st/06210</sup>	20	3,0 <sup>†</sup>	0,0	20	4,0	0,2	20	8,4	1,2
Ecdysone receptor	<i>EcR</i> <sup>112</sup>	11	3,1	0,6	11	3,9	0,3	11	5,9 <sup>†</sup>	2,1
Ecdysone receptor	<i>EcR</i> <sup>Q50st/31</sup>	13	2,8	0,4	13	3,9	0,3	13	8,6	2,1
espinas	<i>esn</i> <sup>f004477</sup>	20	3,1 <sup>†</sup>	0,4	20	3,7	0,6	22	7,9	1,1
espinas	<i>esn</i> <sup>f004477</sup> / <i>Df(2R) Exel 6283</i>	14	2,7	0,6	14	4,0	0,0	16	8,2	1,5
eyes absent	<i>eya</i> <sup>10</sup>	13	3,0 <sup>†</sup>	0,0	13	4,0	0,0	13	7,4	1,2
eyes absent	<i>eya</i> <sup>cli-IID</sup>	9	3,0 <sup>†</sup>	0,0	9	4,0	0,0	9	7,3	1,6
eyeless	<i>ey</i> <sup>2</sup>	15	3,1 <sup>†</sup>	0,4	20	3,9	0,3	15	6,8 <sup>†</sup>	0,7
extra-extra	<i>exex</i> <sup>KK30</sup>	11	3,0	0,0	15	3,9	0,6	15	7,0 <sup>†</sup>	0,9
Fer3	<i>Df(3R) Exel8154 / Df(3R) Exel7309</i>	15	3,0 <sup>†</sup>	0,0	15	3,9	0,3	17	7,6	1,4
forkhead	<i>fkh</i> <sup>l</sup>	10	2,8	0,4	10	4,0	0,0	14	9,8 <sup>†</sup>	1,6

forkhead domain 96Cb	<i>Df(3R)</i> <i>BSC493/</i> <i>Df(3R)</i> <i>BSC679</i>	20	2,9	0,3	20	3,8	0,6	20	6,9 <sup>†</sup>	0,7
germ-cell expressed bHLH-PAS	<i>Df(1)</i> <i>ED7294</i>	13	3,1 <sup>†</sup>	0,4	13	3,9	0,4	13	6,9 <sup>†</sup>	0,7
gemini	<i>Df(2R)</i> <i>BSC350/</i> <i>Df(2R)</i> <i>BSC303</i>	15	2,8	0,7	15	3,7	0,4	15	7,2	1,5
gooseberry	<i>gsb<sup>IX62</sup></i>	19	3,0	0,6	19	4,4	0,8	19	7,6	2,1
giant	<i>gt<sup>E6</sup></i>	15	3,1 <sup>†</sup>	0,3	15	4,0	0,0	15	8,9 <sup>†</sup>	1,5
grain	<i>grn<sup>71</sup></i>	11	2,9	0,3	11	4,0	0,0	11	8,8 <sup>†</sup>	0,9
homeobrain	<i>Df(2R)</i> <i>Exel3071/</i> <i>Df(2R) Exel</i> <i>7166</i>	20	3,1 <sup>†</sup>	0,2	20	4,0	0,2	18	6,8	1,2
huckebein	<i>hkb<sup>2/A321R1</sup></i>	14	2,8	0,4	14	3,9	0,4	14	6,6	0,5
Heat shock factor	<i>Hsf</i>	20	3,0 <sup>†</sup>	0,0	20	4,0	0,0	20	6,9	1,1
jing	<i>jing<sup>01094/22F3</sup></i>	20	2,6	0,5	21	3,4	0,8	20	5,9 <sup>†</sup>	1,8
ken and barbie	<i>ken<sup>02970</sup></i>	14	3,1	0,3	14	4,0	0,0	14	8,8	1,7
klumpfuss	<i>klu<sup>212IR51C</sup></i>	8	2,9	0,4	11	3,8	0,5	11	6,9 <sup>†</sup>	0,6
Kr-h1	<i>Kr-h1<sup>EP2884</sup></i>	11	2,9	0,3	11	3,8	0,4	11	6,6	1,7
Lim3	<i>Lim3<sup>2</sup></i>	16	2,7	0,6	16	3,3 <sup>†</sup>	0,9	16	7,7	0,9
lozenge	<i>lz<sup>N15</sup></i>	15	3,0 <sup>†</sup>	0,0	15	3,9	0,3	15	6,9	1,5
mirros	<i>mirr<sup>SaiD3</sup></i>	20	3,0 <sup>†</sup>	0,0	18	4,0	0,3	20	8,0	1,6
moira	<i>mor<sup>1</sup></i>	11	2,6	0,5	11	4,0	0,4	11	8,8	2,1
molting defective	<i>mld<sup>D2</sup></i>	27	3,0 <sup>†</sup>	0,0	27	4,0	0,4	27	6,8	1,9
nab	<i>nab<sup>52/sh143</sup></i>	10	3,0 <sup>†</sup>	0,0	10	3,7	0,5	10	6,9 <sup>†</sup>	0,7
Nkx6	<i>Nkx6<sup>D25</sup></i>	16	2,9	0,8	16	4,1	0,3	16	7,7	1,8
odd-skipped	<i>odd<sup>01683</sup></i>	10	2,9	0,7	10	4,1	0,3	12	9,3 <sup>†</sup>	1,5
osa	<i>osa<sup>2</sup></i>	19	3,0 <sup>†</sup>	0,0	19	4,2	0,6	19	9,5	2,2
pannier	<i>pnr<sup>wx1</sup></i>	15	3,1 <sup>†</sup>	0,3	15	4,0	0,0	15	7,4	1,7
pannier	<i>pnr<sup>wx6</sup></i>	10	2,5	0,7	10	2,3	1,2	10	6,0	1,0
reaper	<i>rpr<sup>XR28</sup></i>	19	3,1	0,5	19	4,0	0,7	19	7,8	1,0
retained	<i>rtn<sup>1</sup></i>	20	2,5	0,6	20	3,4 <sup>†</sup>	0,8	20	6,5	2,0
rotund	<i>rn<sup>20</sup></i>	12	2,5	0,5	12	4,0	0,0	13	7,7	0,5
sloppy paired 1	<i>slp1<sup>1</sup></i>	17	3,0	0,6	17	4,1	0,8	17	7,4	2,1
sloppy paired 1	<i>slp1<sup>2</sup></i>	8	3,0 <sup>†</sup>	0,0	8	4,5	0,6	14	7,3	1,5
shuttle craft	<i>stc<sup>05441</sup></i>	22	3,1 <sup>†</sup>	0,3	22	3,7	0,5	22	6,8 <sup>†</sup>	0,7

tailless	<i>tll<sup>1/49</sup></i>	11	2,9	1,1	11	4,0	0,0	11	6,8 <sup>†</sup>	0,8
tailless	<i>tll<sup>1</sup></i>	9	2,9	0,6	11	3,8	0,4	11	7,8	2,3
twin of eyeless	<i>toy<sup>bd1</sup></i>	20	3,1 <sup>†</sup>	0,4	20	3,9	0,3	20	7,2	0,6
vein	<i>vn<sup>1067</sup></i>	13	2,9	0,3	13	4,0	0,0	14	7,2	0,8
worniu	<i>wor<sup>1</sup></i>	14	2,7	0,5	14	4,0	0,0	18	8,5	1
Zn finger domain 1	<i>zfh1<sup>00865</sup></i>	17	3,2 <sup>†</sup>	0,6	17	4,0	0,0	17	8,8	1,5
Zn finger domain 2	<i>elav-Gal4 UAS-dicer UAS-Zfh2- RNAi</i>	19	3,2 <sup>†</sup>	0,4	19	4,1	0,3	22	8,5	1,5

n: número de hemiganglios observados

media: número medio de neuronas CCAP/Bursicón por hemiganglio subesofágico, torácico y abdominal

des.: desviación típica de la media

Se analizaron los datos mediante la prueba T de student

<sup>†</sup> señala cuando las diferencias con respecto a los individuos silvestres son significativas con un p-valor < 0.01

\* señala cuando las diferencias con respecto a los individuos silvestres son significativas con un p-valor < 0.001



### 3. Tabla 3: Estudio de las deficiencias Zinn

		Subesófago			Tórax			Abdomen		
Deficiencia	Segmento eliminado	n	media	des.	n	media	des.	n	media	des.
<i>silvestre</i>		70	2,8	0,5	73	3,9	0,2	74	7,7	1,6
<i>Df(2L)net-PMF</i>	21A1;21B7--8	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)BSC106</i>	21B7;21C2	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)BSC4</i>	21B7--C1;21C2--3	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)BSC16</i>	21C3--4;21C6--8	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)BSC37</i>	22D2--3;22F1--2	15	2,6	0,8	16	2,0*	1,3	18	0,8*	1,4
<i>Df(2L)dpp[d14]</i>	22E4--F2;22F3--23A1	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)JS17</i>	23C1--2;23E1--2	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)BSC28</i>	23C5--D1;23E2	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)BSC31</i>	23E5;23F4--5	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)ED250</i>	24F4;25A7	25	2,5	0,7	25	2,8*	1	24	2,3*	1,9
<i>Df(2L)BSC109</i>	25C4;25C8	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)Exel6011</i>	25C8;25D5	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)BSC169</i>	25E5;25F3	16	2,8	0,4	16	2,9 <sup>†</sup>	0,8	16	1,3*	1,5
<i>Df(2L)Exel6013</i>	25F2;25F5	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)ED347</i>	25F5;26B5	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)Exel6015</i>	26B5;26B11--C1	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)Exel9038</i>	26C2;26C3	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)Dwee1-W05</i>	27C2--3;27C4--5	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)Exel7029</i>	27C4;27D4	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)Exel7031</i>	27F2;28A3	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)ED499</i>	27F4;28C4	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)Trf-C6R31</i>	28D2--28E1;28E5--?	37	2,8	0,5	37	2,3*	1,4	36	2,1*	2,1
<i>Df(2L)BSC111</i>	28F5;29B1	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)Exel7038</i>	29C4;29D5	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)BSC215</i>	29D3;29E1	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)BSC143</i>	31B1;31D9	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)Exel7048</i>	31E3;31F5	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)ED746</i>	31F4;32A5	20	2,2	1,1	20	3,1 <sup>†</sup>	1,1	20	4*	2,5
<i>Df(2L)BSC36</i>	32D1;32D4--E1	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)FCK-20</i>	32D1;32F1--3	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)TE-35BC-24</i>	35B4--6;35F1--7	17	0,5*	1	19	0,4*	1,1	19	0,3*	0,9
<i>Df(2L)Exel6038</i>	35D6;35E2	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)Exel7066</i>	36A1;36A12	19	0,6*	1	19	0,6*	0,9	19	0,1*	0,3

<i>Df(2L)Exel8036</i>	36B1;36C9	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)BSC148</i>	36C8;36E3	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)BSC256</i>	36E3;36F2	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)Exel6045</i>	38A3;38A7	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)Exel7077</i>	38A7;38B2	10	2,7	0,7	10	2 <sup>†</sup>	1,3	10	1,2*	2
<i>Df(2L)ED1317</i>	38D1;38F5	19	1,9	1,4	20	1*	1,4	20	0,7*	1,4
<i>Df(2L)Exel7080</i>	38F3;39A2	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)Exel6047</i>	39A2;39B4	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)Exel6048</i>	39B4;39C2	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)ED1466</i>	39E3;40A5	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2L)Exel6049</i>	40A5;40D3	8	1,6*	0,9	8	0,8*	1	11	0*	0
<i>Df(2L)BSC151</i>	40A5;40E5	24	2,7	0,8	24	2,8*	0,9	24	3,3*	2
<i>Df(2L)C'</i>	h35;h38L	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2R)Nipped-D</i>	h46;41C1--6>	15	2,6	1,1	15	3*	1	17	2,1*	2,8
<i>Df(2R)Exel7092</i>	43E5;43E12	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2R)w45-30n</i>	45A6--7;45E2--3	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2R)BSC132</i>	45F6;46B4	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2R)BSC303</i>	46E1;46F3	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2R)BSC281</i>	46F1;47A9	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2R)Exel7124</i>	49F10;50A1	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2R)Exel7131</i>	50E4;50F6	38	2,5	0,9	37	2,3*	1,6	37	1,5*	2,1
<i>Df(2R)Exel7135</i>	51E2;51E11	17	2,1 <sup>†</sup>	1	17	1,9*	1,4	17	1,2*	1,7
<i>Df(2R)Exel6063</i>	52F6;53C4	17	2,1	1,2	17	1,9*	1,5	17	2,4*	3,1
<i>Df(2R)Exel7142</i>	53B1;53C4	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2R)BSC161</i>	54B2;54B17	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2R)BSC355</i>	54B16;54C3	10	1,5	1,6	10	0,8*	1,6	10	0*	0
<i>Df(2R)Exel7150</i>	54E1;54E9	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2R)ED3923</i>	57F6;57F10	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2R)Exel6082</i>	60C4;60C7	#	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>Df(2R)Px2</i>	60C4--60C6;60D9	#	#	#	#	#	#	#	#	#

n: número de hemiganglios observados

media: número medio de neuronas CCAP/Bursicón por hemiganglio subesofágico, torácico y abdominal

des.: desviación típica de la media

Se analizaron los datos mediante la prueba T de student

<sup>†</sup> señala cuando las diferencias con respecto a los individuos silvestres son significativas con un p-valor< 0.01

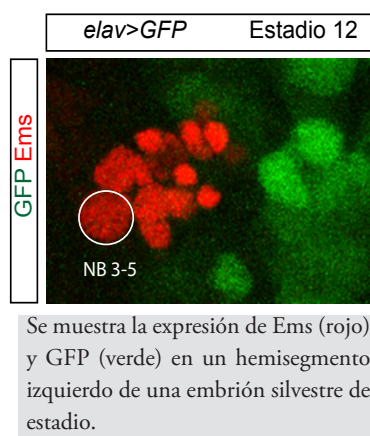
\* señala cuando las diferencias con respecto a los individuos silvestres son significativas con un p-valor< 0.001

# fenotipo silvestre no contabilizado

#### 4. Tabla 4: Análisis de los genes implicados en la especificación de las neuronas CCAP/Bursicón

	Expresión			Fenotipo		
	En el NB3-5	En el linaje del NB3-5	En las neuronas CCAP/Bursícon	De la pérdida de función	De la ganancia de función	
					En NBs	En neuronas
<i>ems</i>	Sí	Sí	$\alpha$ -Ems: No <i>ems-Gal4 UAS-lacZ</i> : Sí	Pérdida de CCAP y Bursícon	sílvestre	sílvestre
<i>isl</i>	No	Sí	Sí	Pérdida de CCAP y Bursícon	sílvestre	sílvestre
<i>el/noc</i>	No	Sí	$\alpha$ -Noc: No <i>elB-Gal4 UAS-lacZ</i> : Sí	Pérdida de CCAP	sílvestre	sílvestre
<i>tsh</i>	No	Sí	Sí	Pérdida de CCAP	sílvestre	sílvestre

### 5. Figura S1. Patrón de expresión de la construcción elav-Gal4 en el linaje temprano del NB 3-5





# Anexo 2: publicaciones

---



Parte del resultados expuestos en esta tesis van a ser publicado en la siguiente publicación:

**Moris-Sanz M.**, Estacio-Gomez A., Alvarez-Rivero, J , Diaz-Benjumea F.J (2014). Specification of neuronal subtypes by different levels of Hunchback Specification of neuronal subtypes by different levels of Hunchback. Development. En prensa

Además, el trabajo desarrollado durante este periodo de investigación ha generado una serie de publicaciones cuyas referencias aparecen aquí indicadas y que no ha formado parte de la Tesis Doctoral:

Benito-Sipos, J., A. Estacio-Gómez, M. **Moris-Sanz, M.** Baumgardt, S. Thor and F.J. Díaz-Benjumea. (2010). A genetic cascade involving the genes klumfuss, nab and castor specifies the abdominal leucokinergetic neurons in the Drosophila CNS. Development 137, 3327-3336

Estacio-Gomez A.\*,**Moris-Sanz M.\***, Schäfer A., Perea D., Herrero P., Diaz-Benjumea F.J (2013). Biothorax-complex genes sculpt the pattern of leucokinergetic neurons in the Drosophila central nervous system. Development 140:2139-48

Herrero P., Estacio-Gomez A.,**Moris-Sanz M.**, Alvarez-Rivero, J , Diaz-Benjumea F.J (2014). Origin and mechanisms of specification of brain leucokinergetic neurons of Drosophila: Similarities to and differences from abdominal leucokinergetic neurons. Dev Dyn. 10.1002/dvdy.2483

